

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

Année 1935

N° 54

THESE
POUR LE
DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris

PAR

Amadou CAMARA

Né le 21 Mai 1908 à Saint-Louis du Sénégal

Influence histochimique
des corps gras bacillaires sur la coloration
des mycobactéries tuées.

Essai d'explication du phénomène
de l'acido - résistance.

Jury :

Professeur LEMIERRE, de la Faculté de Médecine de Paris
Professeur PANISSET, de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort
Professeur VERGE, — — —

PARIS

MARCEL PUYFOURCAT, Imprimeur
26, RUE DES TOURNELLES

1935





Digitized by the Internet Archive
in 2026

PERSONNEL ENSEIGNANT de l'ECOLE VÉTÉRINAIRE d'ALFORT

Directeur honoraire : M. H. VALLÉE, Inspecteur général honoraire
des Services vétérinaires.

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général des Ecoles
Vétérinaires ; H. VALLÉE, DECHAMBRE, G. PETIT.

DIRECTEUR

M. C. BRESSOU, Directeur de l'Institut de Médecine vétérinaire exotique.

PROFESSEURS ET CHARGÉS DE COURS

CHAIRES	MM.
1 ^o Physique, chimie et toxicologie. Pharmacie. Inspection du lait.	N...
2 ^o Anatomie descriptive, systématique, topographique et appliquée des animaux domestiques. Tératologie	BRESSOU,
3 ^o Physiologie. Thérapeutique générale	MAIGNON.
4 ^o Agronomie et hygiène. Botanique et aliments du bétail. Matière médicale	SIMONNET.
5 ^o Anatomie pathologique, histologie, embryologie, industrie et contrôle des viandes et autres produits animaux	VERGE.
6 ^o Parasitologie et maladies parasitaires. Dermatologie et séméio- logie de la peau. Zoologie appliquée. Clinique des maladies parasitaires et dermatologiques	HENRY.
7 ^o Pathologie médicale, séméiologie et propédeutique. Jurispru- dence vétérinaire. Médecine légale. Déontologie. Clinique médicale	ROBIN.
8 ^o Pathologie chirurgicale, séméiologie. Médecine opératoire et ferrure. Clinique chirurgicale	COQUOT.
9 ^o Pathologie bovine, ovine, caprine et porcine. Maladies des animaux de basse-cour. Séméiologie. Médecine opératoire. Obstétrique. Clinique spéciale	LESEBOUYRIES
10 ^o Pathologie générale. Maladies microbiennes et police sanitaire. Microbiologie. Clinique spéciale	PANISSET.
11 ^o Zootechnie et appréciation des animaux domestiques. Econo- mie rurale	LETARD.

AGRÉGÉS ET CHEFS DE TRAVAUX

MM. BERTHELON, BRION, CARPENTIER, GORET, MONVOISIN, MOUSSU, VALADE.

AGRÉGÉS CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

MM. CORDIER et THIEULIN.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions
émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées
comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation
ni improbation.

A MON ONCLE NALLA N'DIAYE

Instituteur en retraite, Chevalier de la Légion d'Honneur.

A MON COUSIN IBRAHIMA KEITA

*Qui ont encouragé nos efforts de leur
chaude et agissante affection.*

Témoignage de notre très affectueuse reconnaissance.

A MON COUSIN IBRAHIMA SOW

*Avec qui j'ai été élevé et que j'aime
comme un frère.*

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LEMIERRE

Qui nous a fait l'insigne honneur d'accepter la présidence de notre thèse.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PANISSET

Pour le remercier de l'aide qu'il nous a apportée à la réalisation de ce travail.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VERGE

Hommages respectueux.

A TOUS NOS MAITRES DE L'ECOLE D'ALFORT

A TOUS NOS MAITRES DE L'ECOLE DE SAUMUR

Hommages reconnaissants.

A LA MÉMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

*Qui nous a quitté trop tôt pour me témoi-
gner assez longtemps l'affection sans bornes
qu'il vouait à l'aîné de ses garçons.*

A LA MÉMOIRE DE MON ONCLE ASSANE DEMBA SOW

*Qui fut un second père pour moi et dont
je fus la légitime fierté.*

HOMMAGE DE PROFONDE PIÉTÉ

A MA VAILLANTE MÈRE

Qui, toute seule, et de bonne heure, a voulu nous élever selon l'idéal qu'elle avait rêvé pour nous ; qui, pour ce fait, nous a donné l'exemple d'un sacrifice quotidien avec l'abnégation maternelle la plus absolue.

Si ce travail devait être un début de récompense à ses efforts et à ses peines, qu'elle veuille bien y trouver un bien faible témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.

A MON FRÈRE

Qui m'a remplacé avec cœur auprès de notre mère durant tout mon séjour en France.

A MA SŒUR

Hommage de fraternelle tendresse.

AVANT-PROPOS

Au moment de nous présenter devant nos Juges, pour subir les derniers examens qui doivent clore à tout jamais notre carrière scolaire, et, avant de nous engager dans cet avenir, si plein de réticence, nous ne pouvons nous empêcher de jeter un regard chargé de regrets sur ce passé récent que nous quittons définitivement.

S'il est un souvenir de jeunesse que nous évoquerons toujours avec plaisir, ce sera celui de cette année 1922, où des fêtes fastueuses au Sénégal, ont marqué le centenaire de la naissance de Pasteur. Parmi les réjouissances qui égalaient en éclat les solennités nationales, il nous fut donné à nous, jeunes Ecoliers d'alors, de suivre dans un film passionnant, agrémenté d'une Conférence qui le commentait jusqu'au bout, la vie du Maître, depuis le nouveau-né qui vagit dans son ber-

ceau, semblable en cela à tous les autres, jusqu'au Savant qui poursuit ses découvertes « dans la paix sereine et le recueillement du laboratoire ».

Des sentiments complexes que nous avons éprouvés, durant cette fête, à la fois et de la vue et de l'esprit, nous est restée une indiscible curiosité de voir un jour, à notre tour, avec l'espoir de les manipuler peut-être, les micro-organismes dont nous venions d'apprendre l'existence.

Du temps a passé depuis. Nous avons trouvé un intérêt croissant dans l'étude des sciences naturelles ; mais M. E. Rauzy, notre Professeur, ne nous révélait que trop peu, à notre gré, des mystères de la biologie, tout en nous laissant comprendre qu'il existait d'autres inconnus plus passionnants encore.

Nous avons donc quitté notre pays avec un esprit insatisfait, pour venir dans cette Ecole d'Alfort, où nous poussait un ardent besoin de savoir. La vocation que nous portions en nous-même, s'est renforcée par la suite, de ce sentiment, qu'en pénétrant dans la maison de Bourgelat, nous nous sommes rangé dans une catégorie d'hommes qui, eux aussi, dans leur domaine, ont pour mission de lutter, de toutes leurs forces, « contre la maladie, la douleur et la mort ».

Pendant nos quatre années d'études, à travers l'enseignement varié de nos Maîtres, nous avons pu joindre au plaisir d'écouter, celui d'apprendre ou de comprendre enfin. Nous voudrions leur dire toute notre reconnaissance, et la dire en même temps à tous ceux qui, pour des motifs divers, se sont intéressés à nous. Mais nous savons d'avance que ce désir ne sera pas réalisé en entier, parce que trop longue serait la liste de tous ceux qui nous ont obligé.

Nous exprimons notre profonde et déférente reconnaissance à M. le Professeur Nicolas, Inspecteur Général des Ecoles Vétérinaires, qui, Directeur de l'Ecole d'Alfort, lors de notre arrivée en France, nous a accueilli avec une paternelle bonté, nous mettant ainsi à l'aise dès la première prise de contact

et qui n'a cessé de nous témoigner un bienveillant intérêt, et, ajouterons-nous, une grande sollicitude.

Notre Maître, M. le Professeur Panisset, voudra bien trouver ici, un hommage tout particulier de notre bien respectueuse affection. Le jour où il nous fit l'insigne honneur de nous admettre comme assistant dans son Laboratoire — qui fut aussi celui de Nocard — réalisant ainsi un rêve que nous avons longtemps chéri en secret, la grande admiration que nous éprouvions déjà pour lui, s'est doublée du même coup, d'une infinie reconnaissance.

Nous nous devons d'associer dans un même hommage d'affectueuse gratitude, Mme et M. R. Nainsouta, Inspecteur Général du service de l'Elevage en A.O.F., notre parrain en la profession, et Mme et M. Th. Nienat, Instituteurs, qui nous ont aimé comme leur propre enfant ; qui, en soutenant nos efforts, ne nous ont jamais refusé le réconfort de leur affection agissante pendant nos moments de découragement ; qui, en un mot, ont fait de nous ce que nous sommes devenu : un homme.

A Mme A. J. Pompière-Broussier, Infirmière, engagée bénévolement pour la durée de la guerre, décorée, fondatrice à Paris de l'Œuvre de l'Encouragement du Soldat Indigène en France, qui, dès qu'elle nous a connu, nous a ouvert, en même temps que son foyer, son cœur maternel ; qui, pour l'heureuse terminaison de nos études, a remplacé auprès de nous, bien affectueusement, notre mère absente. Hommage de filiale tendresse.

A M. et Mme Bellettre et leurs enfants, qui nous ont toujours réservé parmi eux une hospitalité bien française, large et de tous instants ; qu'ils veuillent bien trouver dans cette dédicace un nouveau témoignage de notre inaltérable attachement, pour répondre à l'affectueuse estime qu'ils nous manifestent.

A Mme et M. L. Do Sacramento chez qui, nous avons trouvé, dès notre arrivée à Paris, un foyer et de l'affection ; nous n'avons pas besoin de les assurer de notre bien vive reconnais-

sance et de notre profonde affection.

A tous nos camarades de promotion, qui nous ont adopté d'emblée parmi eux ; qui nous ont témoigné une sympathie réelle et spontanée. Nous avons été infiniment touché par ce sentiment où nous avons trouvé la force de résister dans les moments de profonde nostalgie où, pour ne pas compromettre l'avenir, nous devions oublier que notre vrai foyer se trouve dans un autre continent.

Nous voudrions assurer de notre amitié toute particulière ceux de nos camarades, et de notre respect leurs familles, qui nous ont reçu dans leur sein, et qui nous ont permis ainsi de mieux connaître et d'apprécier davantage la France et les Français.

Nous dédions enfin ce travail aux membres de notre « famille médicale », à qui nous unit une amitié née de trois années de collaboration dans la clinique quotidienne.

PREFACE

Notre choix eut été plus heureux, semblerait-il, si nous avions pris comme sujet de thèse un chapitre de pathologie exotique. Quoi de plus séduisant, en effet, pour un indigène des Colonies, que de présenter à ses juges une étude certainement érudite, portant sur une grande et belle affection coloniale, qu'il sera appelé à combattre tout le long de sa carrière.

Mais nous ne croyons pas nécessaire de souligner, pour la part qui revient aux maladies infectieuses, la hardiesse d'une pareille entreprise, en raison des difficultés mêmes du transport et de la conservation d'un virus jusqu'à la Métropole, à moins que, renonçant à l'étude expérimentale, on ne se borne à publier, avec ou sans commentaires, les résultats ou conclusions de praticiens qui exercent sur place. Nous étions pénétré par ailleurs, de cette idée que la clinique ou la bactériologie coloniales, prises à titre d'exemple, ne doivent pas différer beaucoup, quant à leurs moyens, de celles existant en Europe ; que, par conséquent, notre devoir était plutôt de nous familiariser autant que possible avec les procédés d'investigation en usage en France, afin de les appliquer plus tard, avec fruit, dans nos pays s'ils y sont praticables.

Concevant ainsi notre rôle futur, nous avons accepté d'enthousiasme l'étude que nous a suggérée notre maître, M. le Professeur Panisset, ayant trait aux modifications possibles, d'ordre chimique et biologique, portant sur certaines propriétés des mycobactéries, sous l'influence des corps gras. Primitivement, nous devions envisager l'influence cytochimique des corps gras, due à l'adipo-cire microbienne, influence qui aboutit à l'acido-résistance ; nous voulions ensuite préciser l'influence biologique sur ces mêmes microbes, provoquée par l'adjonction de corps gras, ceux que l'on trouve dans la nature ; cette influence se traduit par la création du pouvoir

pathogène chez certaines mycobactéries saprophytes et par la diminution de ce même pouvoir chez certains acido-résistants normalement virulents. Nous en aurions profité pour essayer de connaître le devenir du microbe cultivé en milieu gras, et la destinée de ce même agent confié à un véhicule huileux. D'ailleurs, à propos de l'influence biologique, nous avons acquis certains résultats expérimentaux que nous nous réservons de publier plus tard.

Nous nous sommes arrêté sur l'acido-résistance parce que nous avons été frappé par cette sorte d'obscurité, qui couvre le phénomène, quant à son processus intime, malgré le nombre considérable de contributions. Il nous a semblé surtout qu'il manquait une étude d'ensemble de la question ; c'est pour cette raison que nous avons cru faire œuvre utile en limitant nos recherches à la seule propriété tinctoriale des mycobactéries.

Notre étude sera divisée en trois chapitres :

Dans une première partie, nous énoncerons des généralités sur l'acido-résistance : sa définition, ses caractères de variabilité et de non-spécificité.

La seconde partie sera consacrée à l'exposé des théories concernant les causes du phénomène ainsi que de son substratum, avec, bien entendu, une brève discussion des résultats apportés par les différents auteurs.

Dans la dernière partie, nous indiquerons nos recherches expérimentales et l'explication que nous proposons.

Avant d'aborder notre sujet, nous avons le devoir de remercier, une fois de plus — et nous ne le ferons jamais assez — notre Maître, M. le Professeur Panisset, qui a mis, à notre entière disposition, toutes les ressources de son laboratoire. On nous avait prévenu déjà que le Maître était affable et bienveillant ; nous l'avons vu manifester, à notre endroit, une paternelle sollicitude. Mais ce qu'on avait omis de nous dire — et nous le savons depuis par notre propre expérience —

c'est que, non content d'enseigner à ses élèves, il gagne aussi leur cœur.

Le Maître, en nous permettant de travailler dans son laboratoire, nous a permis d'éprouver, à l'occasion des diagnostics demandés à son service, la joie très pure de trouver le virus après de fiévreuses recherches ; grâce à lui, nous avons connu le doute qui assaille celui qui expérimente, doute pénible, assurément, qui, bien souvent, pose des cas de conscience également pénibles à supporter. En remettant entre nos mains l'indispensable instrument de travail, notre Maître nous a fait goûter, dans le calme refuge du laboratoire, l'intense poésie du champ du microscope, cette poésie si profonde, si lumineuse et si colorée qu'elle libère l'imagination, qui devient alors « un dimanche de la pensée ».

A celui qui nous a procuré ces émotions si variées, qui nous a fait ressentir les joies et les peines du laboratoire, pouvant aller depuis l'enthousiasme le plus grand jusqu'au découragement le plus profond, qui nous a inculqué la patience nécessaire, réclamée par toute discipline scientifique, nous disons un bien sincère merci.

Nous devons associer à nos remerciements, M. P. Goret, chef de travaux, qui, après nous avoir initié aux techniques délicates de la bactériologie, a bien voulu, par la suite, nous confier certaines de ses recherches.

Nous remercions également M. P. Rinjard, Directeur Adjoint du Laboratoire des Recherches, qui, avec une inlassable obligeance, nous a toujours donné le matériel virulent nécessaire à nos expériences.

Dans ce même laboratoire, nos remerciements vont enfin à M. A. Thierry, chef de service, qui nous a toujours très aimablement reçu, qui s'est intéressé à notre travail, et de qui nous avons reçu de précieux conseils.

L'ACIDO - RESISTANCE

PREMIERE PARTIE

A. — Généralités.

La propriété tinctoriale des microbes du groupe du bacille tuberculeux a suscité une ardente curiosité dont témoigne d'ailleurs le nombre des travaux entrepris pour éclairer son mécanisme. On pourrait s'étonner, à bon droit, de constater qu'aucun autre procédé de coloration n'ait engendré, quant à son processus intime, un pareil enthousiasme de la part des chercheurs qui, *a priori*, ont considéré l'affinité des protoplasmes pour les matières colorantes, chez les microbes non acido-résistants, comme un fait relevant uniquement de la chimie de la teinture.

C'est que l'acido-résistance existe chez des microbes qui ont un aspect particulier, et qui sont caractérisés en général par la lenteur de leurs réactions. En effet, au point de vue de la coloration, il faut chauffer jusqu'à l'évaporation de la matière colorante pour que celle-ci s'imprime avec la force désirée, sur le corps de la mycobactérie, alors que dans les autres techniques, la méthode de Gram par exemple, les manipulations se font à froid et pendant des temps plus courts. Au point de vue de la culture, un délai de 24 heures, parfois 36 et voire même 48 heures suffit en général amplement pour assurer le développement de presque tous les microbes à 37°. Quand la culture est maigre au 3^e ou 4^e jours, on a pour habitude de dire que le microbe pousse difficilement ; mais si au bout de six à sept jours on ne perçoit rien sur le milieu, on le considère comme stérile. *Le Bacille de Koch*, au contraire, placé dans les mêmes

conditions de température et ensemencé dans un milieu adéquat donne des colonies qui commencent à apparaître au bout de la première semaine, qui augmentent progressivement pour atteindre le maximum à la troisième ou quatrième semaines. Au point de vue de la pathologie enfin, la plupart des microbes provoquent des maladies foudroyantes, septicémiques, à évolution très brève ; lorsque l'infection est moins sévère, la maladie peut revêtir une allure chronique qui s'établit rarement d'emblée et qui évolue vers la guérison ou tout au moins vers un état d'équilibre entre l'agent infectieux et l'organisme qui l'héberge. Les bacilles acido-résistants, au contraire, lorsqu'ils sont pathogènes, déterminent toujours un état pathologique d'emblée chronique, qui dure des mois, des années, qui évolue inexorablement suivant des modalités d'avance connues et contre lesquelles nous ne pouvons pas intervenir par des sérums. Dans quelques cas on peut noter des guérisons cliniques ; souvent on parvient à retarder l'évolution, mais celle-ci continue toujours avec la même lenteur à entraîner la déchéance de l'organisme.

Les mycobactéries pathogènes engendrent des maladies pouvant être accompagnées de localisations cutanées, qui sont tenaces parce que nous ne pouvons pas intervenir efficacement contre le microbe, qui sont des mutilations hideuses à cause de leur aspect papillomateux et cancéroforme et à cause de leur siège. La lèpre, par exemple, qui est d'un pronostic médical relativement bénin puisque la maladie n'est pas mortelle, inspire une terreur et une répulsion presque aussi grandes que celles ressenties à l'endroit du cancer. Les tuberculoses en général sont redoutables et redoutées, mais le lupus est aggravé en soi-même par sa localisation apparente et déformante qui frappe davantage les esprits, et qui engendre une horreur égalant presque, aujourd'hui, celle qui était dévolue jadis à la morve faciale. Cependant les ulcères phadégéniques ou les gales généralisées ne bénéficient pas d'un pareil tribut de répulsion.

Les bacilles acido-résistants constituent, pourrait-on dire,

de véritables forteresses qui baignent dans un milieu nutritif, mais des forteresses vivantes et mobiles, percées sans doute de meurtrières qui ne s'ouvrent que pour laisser passer leur décharge de poison. L'organisme, devant ces microbes qui, autrement, se comportent comme des corps étrangers inertes, au même titre que la poudre de licopode par exemple, agit toujours de la même façon : il emprisonne l'agent infectieux dans une série de stratifications mesodermiques ; et lorsque cette tumeur, ce tubercule, vient à s'ouvrir en raison de sa situation superficielle — et c'est le cas des localisations cutanées — il se produit un bourgeonnement envahissant qui donne à la plaie un aspect ulcéré et végétant.

Par conséquent, les caractères très particuliers de la biologie et de la pathologie des acido-résistants devaient les signaler d'une façon spéciale à l'attention des chercheurs.

En raison de l'abondance des travaux sur la propriété tinctoriale des mycobactéries, nous avons pensé que le moment était venu de faire le point et de tenter la synthèse de nos connaissances sur ce sujet. Aussi, allons-nous envisager l'acido-résistance dans sa définition, ses caractères représentés par sa variabilité et sa non-spécificité, ses causes, et la genèse de son substratum ; après quoi, nous essayerons de donner une explication du phénomène.

B. — Définition

Les mycobactéries sont dites acido-résistantes, parce que si on les colore suivant la technique d'Ehrlich ou de Ziehl-Nielson, elles fixent si énergiquement la matière colorante qu'elles résistent à la décoloration consécutive par les acides. Ainsi, dans la technique de Ziehl, après l'action de la fuchsine à chaud, on emploie une dilution d'acide fort, puis de l'alcool. Malgré l'énergie des réactifs décolorants en usage, l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique ou le chlorhydrate d'aniline, les bacilles conservent la fuschine et demeurent colorés en rouge. On dit qu'ils sont acido-résistants et même acido-alcool-résistants, puisque l'alcool est venu ajouter son action décolorante à celle des substances précitées.

Certains chercheurs ont employé à la place des acides des bases caustiques telles que la soude et la potasse ; ils ont obtenu des résultats comparables et ont pu décrire ainsi des bactéries alcalino-résistantes et même des bactéries alcool-alcalino-résistantes.

Cette propriété, pour les mycobactéries, de s'intégrer la fuschine au point de former avec elle un véritable composé, capable de résister soit à l'action des acides ou des alcalis employés isolément, soit à l'action combinée d'un de ces mêmes agents et de l'alcool, est en corrélation avec une morphologie particulière.

Si par exemple, après coloration par la méthode de Ziehl on examine un bacille acido-résistant — le bacille tuberculeux étant pris pour type — on observe qu'il est formé de trois parties essentielles :

a) Un protoplasma, coloré en rouge, que le Fontès révélerait finement reticulaire et en tout cas, contenant des granulations gramophiles.

b) Des granulations cyanophiles réparties dans l'axe du microbe. Nocard et Roux, dès qu'ils ont découvert le moyen pratique de cultiver le bacille tuberculeux, ont minutieusement observé ces granulations dites de Much. Ils avaient noté, en effet, qu'« en vieillissant, les bacilles tuberculeux se colorent d'une façon moins intense et on aperçoit dans leur intérieur, des grains plus foncés : soit au nombre de deux, une à chaque extrémité, soit au nombre de trois, deux aux extrémités et une au milieu du bacille. Un bacille n'a quelquefois qu'un grain, soit au bout, soit au milieu, parfois aussi, on en voit plusieurs, répartis sur toute la longueur. Les grains qui ont tout à fait l'aspect des spores, deviennent plus nombreux et plus nets, avec l'âge des cultures ». On sait aujourd'hui que ces grains sont formés par une substance de nature lipodique (Calmette).

c) Une gangue qui entoure le microbe comme d'autres sont protégés par une capsule. L'analyse chimique a montré que

cette gangue est constituée par des substances ciro-graisseuses.

C. — *Sa variabilité*

Cette réaction de coloration qui a servi de signe critère pour classer tout un groupe de microbes n'est pas d'une fixité absolue : elle peut faire défaut chez des bacilles normalement acido-résistants ; elle peut être perdue par ces mêmes bacilles, et, une fois perdue, elle peut être régénérée dans certains cas.

1° *Absence de l'Acido-résistance.* — La propriété acido-résistante ne se manifeste pas chez tous les bacilles tuberculeux, cette défaillance naturelle trouve une première cause dans l'âge des cultures. Ainsi, Bienstock, en 1886, et l'année suivante Spina, ont remarqué que les jeunes bacilles de Koch n'étaient pas acido-résistants ; ils expliquaient ce phénomène par l'absence de corps gras que les jeunes microbes n'ont pas encore le temps de former. Cantacuzène, en 1908, observe le même fait sur de jeunes *bacilles de Timothée*. Dans des cultures jeunes de ce microbe, il a trouvé une grande partie, parfois la moitié des bacilles qui n'avaient pas la propriété ; leur nombre diminue avec l'âge de la culture et au bout de trois semaines, tous les microbes sont acido-résistants. Si, dans le péritoine d'un lapin, qui, au préalable, avait reçu quelques gouttes d'acide lactique, on injecte des *bacilles de Timothée* âgés de trois semaines (donc acido-résistants), l'animal meurt fréquemment. L'ensemencement du sang du cœur donne des colonies dont les bacilles acido-résistants, rares au début, augmentent leur nombre de jour en jour. Dans l'exudat péritonéal d'un cobaye mort à la suite de l'inoculation de ce microbe on trouve en même temps que des grumeaux de bacilles acido-résistants, une foule de bacilles jeunes, dépourvus de la propriété. Des cultures, faites à partir de ce liquide, donnent des bacilles peu acido-résistants qui le deviennent tous par la suite.

Ce fait d'observation a été très expliqué par Fontès, avec des expériences à l'appui, quand il a entrepris l'étude du virus

filtrable tuberculeux. Si l'on considère la cyclogénie du bacille de Koch, ce microbe, comme tous les autres d'ailleurs, car c'est un fait biologique général, présente des formes jeunes qui donnent des formes adultes granuleuses : ce sont ces formes figurées que l'on observe habituellement. Mais le microbe banal libère ses granulations d'abord dans l'intérieur de son protoplasme où elles se divisent, ensuite dans le milieu de culture où elles sont encore décelables. Ces granulations se fragmentent encore et chaque partie devient un centre de régénération du microbe. Ces granulations très ténues, échappent à l'observation microscopique et constituent le virus filtrant. Beaucoup d'auteurs sont venus confirmer ces résultats, mais H. Durand et J. Gaspard en ont donné la preuve *in vitro*. Leurs études portent sur de vieilles cultures desséchées du bacille tuberculeux. Ils abandonnent le microbe en milieu pomme de terre à l'étuve pendant six mois dans des tubes décapsulés. Au bout de ce temps, un Ziehl montre, en plus des bacilles normaux, des microbes en voie de gènescence, granuleux ou représentés seulement par des granulations solitaires. On y voit également des microbes semblables aux précédents, mais cyanophiles ; on trouve même des éléments de transition rouges avec des granulations cyanophiles aux pôles. La coloration par le Fontès révèle des microbes qui étaient réfringents. Après réensemencement en milieu Dorset et Löwenstein, on voit au bout de 6 à 10 jours des éléments acido-résistants et des éléments cyanophiles mêlés. Au bout de 16 jours il existe dans le milieu des écheveaux bacillaires agglutinés exclusivement acido-résistants. Donc l'acido-résistance est perdue quand le milieu est pauvre, on le régénère après un repiquage de 26 jours, ce qui concorde bien avec les résultats fournis par Fontès et Vaudremer.

Aux termes de leurs recherches, H. Durand et J. Gaspard parviennent précisément aux mêmes conclusions que Fontès : « Il semble donc, écrivent-ils, qu'il y ait là toute une série de formes de passages allant du type commun fortement acido-résistant dans son corps et dans ses granulations à la granu-

lation fine à la limite de la visibilité et dépourvue d'affinité colorante qui semble constituer les formes filtrantes du virus et qui sont les bacilles faiblement acido-résistants, les bacilles cyanophiles, non acido-résistants, les granulations rosées plus ou moins acido-résistantes et plus ou moins volumineuses, comme si la propriété d'acido-résistance du bacille, s'affaiblissait pour disparaître en même temps que le bacille se lyse en granulations de plus en plus petites et de moins en moins colorables sous l'influence des propriétés immunisantes des exsudats ».

Une note très légèrement discordante est fournie par les recherches de F. Bezançon, A. Philibert et P. Hauduroy. Ces auteurs débitent en coupe, des voiles âgés de 4, 5, 6 jours inclus dans la paraffine et colorant par le Fontès. Ils observent de *nombreux bacilles acido-résistants* et une substance non acido-résistante, d'aspect membraniforme et fibrillaire avec des travées anastomosées qui délimitent des alvéoles. Cependant, comme Vaudremer l'a observé en bouillon de pommes de terre, de même que Vaudremer et Havouroy l'ont vu en bouillons glycerinés, les auteurs ont retrouvé des *formes filamenteuses d'aspect mycelien et non acido-résistantes*. L'étude de voiles jeunes issus d'éléments qui surnagent, restes d'un vieux voile tombé dans le fond du ballon, poursuit les mêmes résultats : bacilles acido-résistants et substance cyanophile qui les supporte.

La deuxième cause de l'absence de l'acido-résistance, se trouve dans les « propriétés immunisantes des exsudats » ; le microbe y subit une sorte de mutation. H. Much signalait dès 1908, des formes du bacille tuberculeux qui ne conservaient pas le Ziehl. Il avait observé en effet, qu'à l'autopsie de bovidés inoculés avec des bacilles tuberculeux, il n'était pas rare de voir le poumon parsemé de nodules tuberculeux, alors que l'examen microscopique ne révèle la présence d'aucun bacille acido-résistant ; mais il suffit d'injecter à un cobaye un fragment de ce poumon, si petit soit-il pour faire périr l'animal de tuberculose typique. De même, l'ensemencement de

ces nodules sur milieu artificiel, donne bien souvent une culture caractéristique. Il n'en est pas autrement chez l'homme : dans les abcès froids de l'homme, on a beau rechercher les bacilles acido-résistants, le plus souvent, on n'en trouve pas du tout, alors que l'inoculation aux animaux et la culture fournissent des résultats positifs. Il y a donc, et c'est la conclusion de l'auteur, des formes de bacilles de Koch qui ne fixent pas le Ziehl, formes bacillaires, formes granulées et formes intermédiaires qui prennent le Gram si on fait agir le violet de gentiane pendant 48 heures : l'ensemencement et l'inoculation ont confirmé que les microbes observés étaient du bacille tuberculeux authentique.

Depuis, la littérature fourmille d'exemples semblables et il suffit de citer deux observations cliniques de H. Durand et J. Gaspard. Dans un premier cas, il s'agit d'une endocardite maligne compliquée d'une polysérite tuberculeuse. De l'épanchement pleural on isole un bacille granuleux et cyanophile qui est ensemencé sur bouillon simple ; un mois après, il forme un dépôt composé de microbes cyanophiles. Le repiquage sur milieu Löwenstein donne au bout de 5 semaines des éléments cyanophiles et acido-résistants. Le liquide pleural a été inoculé à un cobaye qui, à l'autopsie, a montré en même temps que des lésions typiques de tuberculose, des bacilles acido-résistants ; son sang porté sur Löwenstein a également donné une culture de bacilles acido-résistants.

L'autre cas est constitué par une adénite cervicale chez un tuberculeux pulmonaire qui élimine déjà des bacilles dans ses crachats. Le frottis du ganglion montre mélangés des granulations acido-résistantes, des granulations en diplocoque, des bacilles dont le corps presque invisible porte des granulations fortement cyanophiles. Le ganglion malade, broyé et ensemencé sur Löwenstein, donne des formes anormales de bacilles de Koch, incurvées, à extrémités renflées en massues où des corps gris avec granulation terminales à chaque extrémité. L'inoculation au cobaye a donné un résultat positif.

La mutation peut être encore plus prononcée. H. Sweany

cultive deux souches anormales de bacilles tuberculeux et y remarque des formes de dégénérescence qui se distingueraient en deux groupes. Tous avaient perdu l'acido-résistance, mais certains offraient l'aspect de cocci (granulations) ou de bacilles qui se développaient lentement et reprenaient plus ou moins tardivement la forme typique ; d'autres dont le développement s'effectuait au contraire rapidement, étaient granuleux, d'aspect diphtéroïde, et ne reprenaient les caractères du bacille typique qu'après un ou plusieurs passages chez l'animal. Ce retour à la forme bacillaire se poursuit d'une manière progressive, l'acido-résistance apparaissant en premier lieu dans les granulations ; en même temps les propriétés pathogènes se modifient : les lésions qu'ils provoquent, d'exsudatives qu'elles étaient au début, deviennent prolifératives avec présence de cellules épithélioïdes et de cellules géantes. Dans quelques cas, Sweany a noté une dégradation si profonde qu'il lui a été impossible de restituer aux germes leurs caractères originaux.

Il faut signaler enfin qu'il n'y a aucun parallélisme entre le pléomorphisme du microbe et la présence ou l'absence de l'acido-résistance. H. Durand et J. Gaspar ont examiné systématiquement des produits pathologiques d'origine diverse et voici ce qu'ils ont vu à côté du microbe banal : des granulations acido-résistantes isolées ou groupées en diplocoques ou en zooglées ; des formes à granulation bi-polaire ; des formes bacillaires faiblement acido-résistantes, parfois à peine visibles ; des bacilles et des granulations cyanophiles solitaires, ou en amas, et parfois mêlés ; des bacilles et des granulations acido-résistantes, des bacilles n'ayant plus rien du microbe ou présentant seulement une trace de granulation acido-résistante et seulement explorables par le Fontes qui montre le corps et les granulations avec la longueur et la forme des granulations du bacille acido-résistant commun ; des microbes très longs.

2° — *Perte de l'acido-résistance. — Sa régénération*

Artificiellement, on peut faire perdre leur acido-résistance

aux microbes qui en sont pourvus. Il suffit d'intervenir sur les milieux de culture dont la composition, la richesse, le p.H. sont des facteurs importants pour le maintien de la propriété tinctoriale.

En 1898, Ferran présentait à l'Académie des Sciences sa « nouvelle découverte sur le bacille de la tuberculose et la solution expérimentale du problème de la prophylaxie et de la guérison de cette maladie ». Il avait vu qu'en supprimant la glycérine et en faisant des passages sur des milieux différents, l'acido-résistance était abolie. Or la propriété tinctoriale, pensait-on à cette époque, était due à l'existence de la cuirasse ciro-graisseuse qui protège le bacille tuberculeux ; sa disparition devait donc coïncider avec celle de la gangue adipo-cireuse et le bacille devait être plus exposé. On avait fondé trop d'espoir sur les bacilles nus.

En tout cas, en ce qui concerne la disparition de l'acido-résistance, les résultats fournis par Ferran ont été amplement confirmés par la suite.

Vaudremer constate qu'en ensemençant sur gélose ordinaire non glycinée ou fortement glucosée certains échantillons de bacilles de Koch humains ou bovins, pathogènes ou tuberculigènes, depuis longtemps adaptés au milieu glyciné, l'acido-résistance disparaît chez le bacille humain dès le premier passage sur gélose ordinaire et chez le bacille bovin, par culture sur milieu glucosé à 20 pour cent. L'acido-résistance ainsi perdue est récupérée si on reporte les microbes en milieu glyciné ou sur gélose normale additionnée de sérum frais. Vaudremer en conclut que l'acido-résistance est une propriété facultative.

Le p.H. du milieu de culture influe également sur l'acido-résistance. W. Frei et N. Pokschichewsky cultivent des bacilles acido-résistants sur des milieux acides et parviennent de la sorte à les dépouiller complètement de leur acido-résistance ; il a suffi aux auteurs de cultiver ces mêmes microbes pendant quelque temps en milieu alcalin pour voir la propriété se rétablir.

Suneyaga, lui aussi, repique en série tous les deux jours la zone périphérique des colonies de bacilles tuberculeux cultivés sur gélose glycinée à 2 pour cent et légèrement acide ou alcaline ; il ne réussit pas à créer une race de microbes héréditairement dépourvue de l'acido-résistance. Il constate, après Wherry, que les microbes ayant cultivé en milieu riche, résistent davantage à la décoloration par les acides que ceux qui ont été ensemencés dans les milieux pauvres.

L'action de la richesse du milieu a été mise en évidence par les recherches de A. I. Kendall, A. A. Day et A. W. Walker. Ces auteurs cultivent le bacille de Koch dans une sorte de milieu de Sauton privé néanmoins de glycérine, de fer et d'acide citrique, mais additionné soit de dextrose, soit de mannite, soit de glycérine, c'est-à-dire de substances qui ont une certaine parenté chimique puisque toutes sont des polyalcools. Dans ces conditions, le bacille tuberculeux est capable de préparer ses dérivés azotés à partir de l'asparagine, et assure ses propriétés d'acido-résistance grâce à des substances aussi simples que la mannite, la dextrose ou la glycérine. Cette dernière observation est en contradiction, en ce qui concerne les sucres, avec les résultats indiqués par Vaudremer.

Vollum, de son côté, observe que des souches bovines produisent des formes granulaires acido-résistantes en milieu Kirchner (sérum, asparagine, citrate, glycérine), et en bouillon de pomme de terre glyciné. Ces deux milieux favorisent la croissance. Au contraire dans le bouillon Winsin ou dans le Kirchner non glyciné, les formes granulaires acido-résistantes n'apparaissent pas. Vollum en déduit que les souches donnant des formes non acido-résistantes dans un milieu très nutritif sont constituées de germes faibles ; que la pauvreté du milieu, notamment le manque d'hydrate de carbone empêche l'apparition de l'acido-résistance et que l'existence de granulations acido-résistance témoigne d'une haute vitalité des bactéries alors que la non coloration par le Ziehl traduit l'atténuation des fonctions vitales.

Enfin, une dernière série de causes peut supprimer artificiellement l'acido-résistance par suite de l'action *in vitro* de divers agents sur les mycobactéries, mais sans qu'il soit possible de régénérer dans tous les cas la propriété perdue. Ces agents sont d'ordre physique, chimique ou bio-chimique.

Robert Koch, le premier, Benains et Shermann ensuite, ont observé qu'un simple acte mécanique, le broyage par exemple, s'exerçant sur le bacille tuberculeux, suffit à lui faire perdre son acido-résistance. P. Spehl signale un fait intéressant qui, dans certaines circonstances, suffirait à expliquer les différences de coloration observées chez divers bacilles acido-résistants. Parmi les agents capables de modifier l'acido-résistance, la chaleur joue un rôle manifeste : entre 60 et 180°, la proportion des bacilles qui ne fixent pas la fuchsine croît avec l'élévation de la température et la durée de l'exposition ; il y aurait même, selon Spehl, des modifications quotidiennes de l'acido-résistance.

Des causes efficientes chimiques ou bio-chimiques, peuvent également intervenir pour faire varier l'acido-résistance. C'est ainsi qu'en étudiant la culture du bacille tuberculeux sur le milieu à l'œuf de Besredka, M. P. Isabolinsky et V. I. Guïtovich ont constaté, après six semaines de culture à 38°, la bactériolyse des microbes, révélée par des modifications morphologiques et tinctoriales. Pour préciser le mécanisme de cette lyse bactérienne, les auteurs ont mis en contact, *in vitro*, des bacilles tuberculeux avec des substances dont la plupart entre dans la composition des tissus humains. Ils ont vu ainsi que la lécithine, la cholestérine, le savon vert, KCl, les alcalis exercent sur les émulsions de bacille de Koch une action désintégrante plus ou moins marquée selon les substances ; que l'effet maximum est obtenu avec la lécithine et le savon vert (deux corps gras), que la cholestérine et la glycérine (deux alcools) agissent faiblement, que les alcalis tels que le glycocholate de Na, le bicarbonate de Na, la soude caustique produisent une certaine bactériolyse, alors qu'après lavage, les mi-

crobes reprennent leur acido-résistance, à un faible degré cependant.

P. Domingo et E. Piera cultivent le bacille tuberculeux sur le même milieu de Besredka, prélèvent ensuite la culture et la dessèchent ; la poudre obtenue est mise en contact avec l'essence de thérébentine pendant 6 heures à la température du laboratoire. Après centrifugation, ils décantent et recommencent l'opération ; ils décantent une seconde fois après deux heures de nouveau contact. Le sédiment est desséché, trituré et émulsionné dans de l'eau. Dans ces conditions, les auteurs constatent que l'essence de thérébentine dissout la substance acido-résistante intergranulaire des bacilles tuberculeux adultes, ainsi que la substance intergranulaire et les granulations des vieux bacilles et qu'elle respecte les bacilles tuberculeux jeunes ainsi que les granulations des adultes.

Les acides gras non saturés exercent sur le bacille tuberculeux une double action qui modifie et l'acido-résistance et la virulence. Ch. Boissevain, en Amérique, traite des Bacilles de Koch, sans deshydratation préalable par un acide gras de la série aliphatique et remarque que les microbes perdent à la fois et leurs propriétés tinctoriales et leur pouvoir pathogène. Cette action semble liée à l'existence d'une longue chaîne de carbone (C^5) et d'un groupement acide ($COOH$) ; elle croît avec le degré de solubilité des acides gras dans l'eau et leur absorbabilité par les bacilles.

Nous avons à peine besoin de mentionner l'action de l'antiformine qui dépouille de leur acido-résistance les mycobactéries saprophytes, alors qu'elle laisse intacte la propriété chez le bacille tuberculeux vrai. Cette influence a été heureusement mise à profit dans le diagnostic bactérioscopique différentiel du bacille de Koch.

D. — *Sa non-spécificité*

L'acido-résistance n'est pas une propriété propre et spéciale aux microbes dits acido-résistants et qui les distingue spécifiquement des autres microbes. On retrouve la même propriété

chez des microbes mal connus, non encore classés dans le groupe des acido-résistants et chez certains champignons inférieurs. Dans le courant de l'exposé des théories chimiques de l'acido-résistance, on aura l'occasion de citer diverses substances qui résistent à la décoloration par les acides. La propriété enfin peut être artificiellement créée chez des microbes banaux, non acido-résistants.

1° — *Acido-résistance chez des microbes mal connus.*

E. Marchoux cite chez l'homme le cas d'un pseudo-lépreux venu de Haïti. Des lésions cutanées de ce malade, rappelant exactement des lépromes, l'auteur a isolé un bacille acido-résistant qu'on peut distinguer du B. de Koch et du B. de Hansen ; ce microbe se montre entouré d'une substance claire, réfringente, de nature lipoïdique et soluble dans les graisses. Traum a décrit chez le bœuf une lymphangite due à un organisme alcool-acido-résistant distinct du bacille tuberculeux tant par le caractère et la vitesse de développement des cultures que par l'aspect des préparations microscopiques faites à partir de ces cultures.

2° — *Acido-résistance chez les champignons*

Ce fait est connu depuis longtemps et, dès 1888, Nocard a décrit l'*Actinomyces farcinica*, acido-résistant, agent pathogène du farcin de bœuf. Depuis Burneth a signalé chez des bovidés qui ne réagissaient pas à la tuberculine, deux cas de pneumonie typiquement tuberculeuse, due à un streptothrix qu'il a appelé *Actinomyces pulmonalis*. Très récemment enfin (1933), Bishop et Fenstermacher ont isolé à partir d'une vache un actinomyces qui se rapproche du type *astéroïdès* et qui avait déterminé des lésions du poumon, de la plèvre, du foie et des reins rappelant celles de la tuberculose.

3° — *Création de l'acido-résistance chez des micro-organismes non acido-résistants.*

Des chercheurs, se basant sur la théorie d'après laquelle l'acido-résistance est due aux corps gras du microbe, ont tenté

de provoquer l'apparition de cette propriété chez des microbes qui, ordinairement, en sont dépourvus, en leur faisant assimiler des corps gras. L.-P. Paolo, en 1905, cultive différents microbes sur la graisse, notamment le *bacillus anthracis* et le *bacillus subtilis*. Une bactériodie charbonneuse devenue acido-résistante par une culture de quinze jours sur du beurre est inoculée à un animal et le tue ; du sang du cœur on isole une bactériodie de Davaine encore acido-résistante, dont la culture sur milieu ordinaire fait disparaître la propriété. Le *B. diphtérique*, le *Vibrien cholérique* peuvent devenir transitoirement acido-résistants, mais l'auteur a toujours échoué en ce qui concerne le bacille typhique, le colibacille, les bacilles pesteux et *prodigiosus*.

En 1933, reprennant les expériences précédentes, Guilio Denes cultive en bouillon nutritif additionné de glycérine, de cire ou d'huile minérale lourde, ou surtout de lait non totalement écrémé. A l'encontre de Paolo, il a réussi à former une capsule acido-résistante autour du *B. diphtérique*, du *B. prodigiosus* et du *B. Coli commune*. Denes pense que le revêtement acido-résistant superficiel est formé par un processus physique et chimique aux dépens des lipoides du milieu.

Conclusions

Cet aperçu sur les caractères de l'acido-résistance, sa variabilité et sa non spécificité, montre que cette propriété n'a pas une valeur critère pour permettre à elle seule le diagnostic bactérioscopique d'un microbe dit acido-résistant. Borrel, en 1904, dénonçait énergiquement cette faiblesse : « réactions de l'organisme, coloration spécifique due à la présence des matières grasses dans le corps des bacilles acido-résistants, écrivait-il, ne constituent pas des caractères suffisants pour identifier les espèces ; on connaît des bactéries non acido-résistantes qui provoquent la formation de tubercules typiques et on n'a pas encore proposé de réunir en une seule espèce tous les microbes qui prennent le Gram.

DEUXIEME PARTIE

A. — Causes de l'acido-résistance

Après la découverte du phénomène de l'acido-résistance, on apprit par la suite que cette propriété tinctoriale n'existait que chez les microbes pourvus d'une capsule d'un certain genre et que ceux qui ne possédaient pas cette gangue, n'étaient pas acido-résistants.

On pensa donc, à priori, que l'acido-résistance était due à la coque des mycobactéries, d'où naquit l'idée de préciser les propriétés physiques et la nature chimique de cette formation périmicrobienne toute particulière. Après que l'analyse eut révélé la nature ciro-adipeuse de cette gangue, on délaissa la capsule elle-même pour incriminer en bloc les corps gras microbiens. Les premiers résultats apparents ont encouragés à poursuivre les recherches qui n'ont été dirigées que dans ce sens : « Les auteurs, note Goris, se sont bornés à extraire les matières grasses ou cireuse dont il (le bacille tuberculeux) est imprégné, par l'emploi successif de divers solvants, et à essayer l'action des substances isolées vis-à-vis de l'organisme animal ou vis-à-vis des réactifs colorants ». On comprend cela d'autant plus aisément que le bacille de Koch est le microbe dont on peut extraire le maximum de corps gras et Goris lui-même n'a pas cherché ailleurs la clé de l'énigme. Il excuse, d'ailleurs, cette tendance unilatérale des recherches, en faisant valoir que « la nature cireuse de son enveloppe, les affinités particulières du bacille tuberculeux pour le fuchsine devraient, en effet, inciter plus spécialement à ce genre de recherches. »

Le grand nombre de théories qui se proposent d'expliquer l'acido-résistance prouve que le problème est loin d'être élucidé. Pour exposer les différentes hypothèses, nous avons à choisir entre une énumération chronologique fastidieuse et peu claire ou une étude critique qui dépasserait le cadre de cette modeste contribution. Nous avons préféré grouper les thèses suivant qu'elles considèrent l'acido-résistance comme

un phénomène physique, ou qu'elles l'expliquent par des processus physico-chimiques ou par des réactions chimiques pures.

1° — *Théories physiques.*

Les théories physiques sont les premières en date (1882). Ehrlich qui découvrit le phénomène de l'acido-résistance, l'expliquait par l'imperméabilité de la membrane cellulaire. Cette théorie fut définitivement ruinée lorsque Ziehl montra que la membrane était perméable puisqu'elle se laissait traverser par l'acide azotique décelable à l'intérieur de la cellule.

Selon Fischer (1889) et Pappenheim (1901), l'acido-résistance n'est pas un phénomène d'imperméabilité, mais bien au contraire un phénomène d'absorption : elle traduit la faculté de fixation de la matière colorante par le protoplasme bacillaire.

2° — *Théories physico-chimiques.*

Les explications purement physiques, ne sont pas entièrement satisfaisantes : on conçoit très bien la pénétration de la matière colorante dans le stroma microbien, mais on ne comprend pas par quel processus elle s'y fixe et y demeure malgré l'action consécutive d'un acide, de l'alcool et de l'eau, toutes substances qui devraient entraîner le colorant. Aussi fut-on amené à faire intervenir les lois de la physico-chimie là où la physique seule s'est montrée impuissante à éclairer intégralement le problème de l'acido-résistance.

Pour Hammerschlag (1891), l'acido-résistance aurait pour substratum un complexe double albumoso-cellulosique qui existe à l'intérieur de la cellule bactérienne.

La meilleure théorie physico-chimique — nous voulons dire la plus consistante — est celle énoncée en 1934 par Sordelli et Arena. Les auteurs posent que la membrane microbienne possédant une perméabilité variable suivant les substances qu'elle dialyse qu'elle se laisse traverser avec des vitesses différentes par les acides, les alcalins, l'eau et la fuchsine, mais qu'elle

demeure fermée à la fuchsine acide. Dans la coloration par la méthode de Ziehl, la fuchsine pénètre bien dans l'intérieur de la cellule et y forme, au contact des albumines, un complexe fuchsine-proteine ; l'acide agissant par la suite s'attaque à ce complexe et libère la fuchsine qui, devenue acide, ne peut plus traverser la membrane et quitter le microbe. L'eau de lavage, à son tour, enlève l'acide et quitte la fuchsine ; celle-ci redevenant elle-même et traversant la membrane moins rapidement que l'acide, diffuse dans tout le microbe et le colore.

C. — Théories Chimiques.

Les théories chimiques sont intervenues de bonne heure pour combattre les explications physiques insuffisantes, proposées pour l'explication du phénomène de l'acido-résistance ; elles sont du reste les plus nombreuses et les mieux fondées sur l'expérimentation. Elles semblent avoir comme point de départ le postulat énoncé en 1888, par Unna, d'après quoi l'acido-résistance résulte d'une combinaison *insoluble* entre la substance bacillaire et la matière colorante. Chimiquement parlant, pour que la coloration d'un corps par un autre, soit possible, il ne suffit pas seulement qu'ils réagissent pour donner un composé insoluble : dans un cas, prévu par les lois de Berthollet, $\text{SO}^4 \text{Ba}$ et ClNa donnent une double décomposition totale et complète et $\text{Cl}^2 \text{Ba}$ formé s'élimine de la réaction parce qu'il est insoluble sans constituer pour cela une matière colorante. D'autre part, la solubilité d'un corps ne lui enlève pas ses propriétés colorantes, pour la simple raison qu'il existe des solutions colorées et qui colorent. Dans le cas de l'acido-résistance qui nous préoccupe, il faut une triple condition : la combinaison formée doit constituer elle-même une matière colorée ; elle doit demeurer inattaquable par les réactifs décolorants employés ; une fois fixée sur le microbe, elle ne doit plus le quitter.

On pourrait présenter les théories chimiques dans l'une des quatre catégories selon que leurs auteurs assignent comme cause à l'acido-résistance :

- Soit une matière albuminoïde ;
- Soit une matière grasse ou ses composants ;
- Soit une substance indéterminée ;
- Soit plusieurs substances à la fois.

1° — *Acido-résistance due à un protide*

On se souvient que Hammerschlag invoquait comme cause à l'acido-résistance, l'existence dans les bacilles d'un complexe double, albumoso-cellulosique. Certains auteurs ont dissocié ce complexe, pour ne retenir que la portée protéidique à laquelle ils restituent sa réactivité chimique. En 1909, Gasis émet l'avis que l'acido-résistance serait imputable à une substance albuminoïde par simple analogie avec l'affinité tinctoriale de granulations éosinophiles de leucocytes. L'auteur croit qu'il y a identité chimique là où se trouve la même coloration par les mêmes matières colorantes. Théorie ingénieuse sans doute, fondée sur une induction que rien ne prouve originellement parfaite et qui, du même coup, échappe au crible de l'expérimentation.

Dans cette voie Gasis avait été précédé par Helbing qui, dès 1901, pensait que l'acido-résistance est due à une substance voisine de la chitine ou semblable à cette matière parce que les œufs de taenia, pourvus d'un revêtement chitineux, sont susceptibles de se colorer par la même méthode que le B. de Koch. La même année, Ruppel dégraisse des bacilles par tous les solvants des corps gras et constate que la propriété d'acido-résistance n'est pas abolie malgré le traitement : il en déduit que la réaction tinctoriale est due à une substance respectée par les dissolvants des corps gras, donc une albuminoïde. L'hypothèse d'un hydrate de carbone, la cellulose, par exemple, n'a même pas été envisagée : il est vrai aussi que l'auteur a retrouvé chez les autres champignons, la substance albuminoïde, responsable de l'acido-résistance.

2° — *Acido-résistance due à un lipide.*

La plupart de ceux qui ont voulu préciser la cause de l'acido-

résistance, sont d'accord pour affirmer que la propriété tinctoriale des mycobactéries, trouve son origine dans les corps gras totaux ou dans certains de leurs composants que recèle le microbe soit dans sa gaine périphérique, soit dans l'intimité de son protoplasma et dans sa capsule à la fois. Pour s'en assurer, il suffirait de dégraisser les microbes aussi complètement que possible et de voir d'une part s'ils ont conservé après le traitement, l'acido-résistance et, d'autre part, si les corps gras extraits dans ces conditions se montrent fuchsinophiles : c'est ce qui a été tenté.

En 1896, Klebs constate que des bacilles dégraissés perdent leur acido-résistance, alors que l'extractum gras fixe la fuchsine, la coloration résistant à l'action des acides. Robert Koch, la même année, observe le même fait après avoir délipider des bacilles par la lessive de soude.

En assurant un contact de plusieurs jours, entre des bacilles et l'alcool méthylique, W. Bulloch et Macleod en 1901, ont constaté que dans ces conditions l'acido-résistance n'était pas entièrement enlevée ; l'extract alcoolique, filtré à chaud, donne, en refroidissant, un précipité blanchâtre qui, d'après ces auteurs, est constitué par la substance responsable de l'acido-résistance.

Selon Babès et Cantacuzène (1905), des bacilles tués, épuisés par l'alcool méthylique et l'éther de pétrole, perdent leur acido-résistance en 48 heures. Vallée en 1906 confirme ces résultats, il réduit le plus possible l'emploi de moyens chimiques et met en œuvre des agents mécaniques. Des bacilles lavés, égouttés et desséchés au vide sulfurique, sont placés dans un bocal adapté à un appareil à oscillation, contenant des billes de verre et de l'éther de pétrole chimiquement pur. Après un contact de 60 heures environ, tous les bacilles ont perdu l'acido-résistance.

La plus grande preuve du rôle des corps gras dans l'acido-résistance, a été apportée par Roux et Borrel. Ces savants, en 1904 ont complètement dégraissés les bacilles tuberculeux en

les soumettant d'abord à l'action d'une solution faible de HCl portée à l'ébullition, ou à l'action de la chaleur du four à flamber maintenu entre 140° et 150°, en épuisant ensuite par le xylène à chaud. Les bacilles, après ce traitement, perdaient l'acido-résistance, alors que la « substance grasse totale extraite par le xylène, étalée sur une lame, se colore très énergiquement et la coloration résiste aux acides » (Borrel).

L'analyse ne s'est pas contentée d'un résultat aussi global ; on a voulu isoler comme une entité chimiquement définie, la substance cause de l'acido-résistance. On est parvenu à déterminer et à accuser des corps gras qui comportent une partie inaponifiable, les cires.

En 1907, Deycke Pascha et Rached Bey avaient découvert dans le bacille de la lèpre, une cire qu'ils ont dénommée *nas-tine* et qui confère la propriété d'acido-résistance au microbe. Cette matière colorable par le Ziehl en présence de traces d'acide gras n'a pas été retrouvée par les auteurs au niveau du bacille tuberculeux. Fontès aussi, en 1909, a mis en évidence à partir du B. de Koch, une cire qui se montre acido-résistante. Du reste, Aronson le premier, avait réussi, dès 1898, à extraire du bacille de la tuberculose, une cire douée de l'acido-résistance. Plusieurs traitements à l'éther, même à l'alcool-éther à chaud, laissent intacte la propriété tinctoriale, mais l'addition d'une faible quantité d'acide (2 pour 10 d'HCl dans le mélange d'alcool-éther) fait disparaître à l'ébullition, la réaction de coloration. Après les travaux d'Aronson, la cause de l'acido-résistance semblait si péremptoirement établie que Marmoreck pouvoit tirer ces conclusions comme d'un théorème : les jeunes bacilles ne sont pas acido-résistants, donc ils n'ont pas encore de capsule adipo-cireuse ; les vieux bacilles ont perdu la propriété, c'est signe qu'ils ne sont plus capables de former de la cire.

A propos des cires, cause de l'acido-résistance, il faut enfin citer une importante contribution apportée par Machebœuf et ses élèves. En collaboration avec G. Lévy et N. Fethke, Machebœuf, expérimente sur le bacille Tuberculeux tué par la cha-

leur (résidu de la préparation de la tuberculine). Il soumet ce microbe à l'action successive de divers solvants, tous à froid sauf en ce qui concerne l'alcool et obtient dans l'ordre, les fractions ci-après :

1° Fraction acétonique, dite fraction A, formée d'une substance molle, grasseuse, assez fortement teintée en rouge.

2° Fraction alcoolique dédoublable en deux :

a) Partie soluble, même à froid, ou fraction B, constituée par une masse grasseuse assez dure, légèrement teintée en jaune orangée.

b) Partie soluble à chaud seulement, donc précipitant à froid pour donner la fraction C, masse cireuse, blanche, dure et *très fortement acido-résistante*.

3° Fraction étherée ou fraction D : c'est une masse vitreuse, transparente, légèrement ambrée.

4° Fraction chloroformique (fraction E) qui a le même aspect que la précédente.

La fraction C contient beaucoup d'impuretés, notamment des composés phosphorés (0,7 pour cent). Pour la purifier, les auteurs, soumettent cette fraction C à une extraction successive de la matière acido-résistante. L'alcool chaud donne une fraction C¹ non acido-résistante, et une solution de la substance à rechercher. Cette solution refroidie à + 15° abandonne un précipité C² qui se montre fortement acido-résistant mais qui contient encore des impuretés. La solution restante est refroidie à 0°, un nouveau précipité se forme (C³) fortement acido-résistant, qui est peut-être, lui aussi, constitué par du C² moins pur.

C³, repris par l'alcool et le benzène, donne, après une série d'extractions, une substance que les auteurs ont appelée φ . Pour lui enlever ses dernières impuretés, φ est soumis à plusieurs épuisements par l'acétone. On obtient finalement φ chimiquement pur, très fortement acido-résistant. C'est une cire blanche, dure, très fortement soluble dans la benzine, le

chloroforme, l'éther de pétrole, assez fortement soluble dans l'acétone chaud, dans l'alcool chaud, très faiblement soluble dans l'alcool froid à peu près insoluble dans l'acétone froid.

Le bacille vivant a donné des résultats un peu différents. Machebœuf, avec J. Dyeryck et R. Stoop, ont soumis le bacille vivant aux mêmes extractions. Cinq fractions ont été encore obtenues ; les trois premières ayant été extraites à froid, successivement par l'acétone, l'éther et l'alcool méthylique. Ces trois dissolvants ont enlevé des lipides non phosphorés, dépourvus de l'acido-résistance et du pouvoir haptène, sauf en ce qui concerne la solution alcoolique qui a un pouvoir haptène intense. L'extraction s'est poursuivie ensuite par l'alcool éthylique bouillant qui dissout deux sortes de substances : les unes solubles à froid, douées d'un pouvoir haptène assez fort et pourvues d'une très forte acido-résistance. La dernière fraction est extraite par le benzène bouillant : elle contient des substances sans acido-résistance et sans pouvoir haptène.

Les chercheurs n'avaient pas attendu ces résultats si précis pour pousser davantage la dissection, pour ainsi dire, de la molécule du corps gras et chercher à connaître lequel des composants plutôt que l'autre constitue le substratum de l'acido-résistance. Aussi les acides gras et les alcools ont-ils été accusés tour à tour d'être le support de la propriété tinctoriale chez les mycobactéries.

Dorset et Emery pensaient, en 1906, que l'acido-résistance trouve son origine dans un alcool isolé à partir de l'extrait éthéré saponifié des microbes. J. Camus et L. Pagniez constatent en 1905 que parmi les graisses extraites du B. de Koch, on a signalé la cire, des corps et des acides gras divers. Ils ont vu que la plupart des acides gras, notamment ceux qui ont un poids moléculaire élevé, donc insolubles, colorés par la méthode de Ziehl ou d'Ehrlich, se montrent acido-résistants.

Les huiles n'ont pas cette propriété, mais les graisses, rances (par conséquent acides), sont également acido-résistantes. Cette propriété pour se manifester dans les corps gras ordi-

naires, ne nécessitent la présence d'acides gras libres. Or en étudiant leur pharmacodynamie par la voie endobranchique les auteurs ont trouvé que l'injection d'acides gras dans le poumon sain par la trachée à la dose de 0 gr. 10 à 0 gr. 40, y détermine des lésions qui, par leur évolution rappellent celles de la tuberculose pulmonaire et « peut-être davantage les lésions produites par les poisons locaux du bacille tuberculeux étudiés par Auclair et principalement celles dues à la chloroformo-bacilline ». Sans l'affirmer formellement, les auteurs nous laissent conclure — et il n'y a qu'un pas vite franchi — que l'acido-résistance est due aux acides gras libres dans le protoplasma du bacille tuberculeux et qu'ils engendrent les altérations anatomiques de la maladie.

Pour Sakae Tamura (1913), au contraire, l'acido-résistance n'est engendrée ni par les corps gras, ni par les acides gras, mais par un alcool libéré par la décomposition des corps gras et qu'il a appelé *mykol*, pour rappeler qu'il l'a isolé du *mycobactérium lactiticola perrugosum*.

C'est en 1920 que Goris, avec la collaboration partielle de Liot, publie son mémoire (1) qui situe la question de l'acido-résistance. Goris épuise au chloroforme à chaud et sépare avant l'évaporation, une substance qu'il a dénommée *hyalinol* et une masse butyreuse qu'il analysera. La solution chloroformique est épuisée par l'alcool à 95° bouillant et elle donne des éléments minéraux et des traces de cholestérine. La solution alcoolique est reprise par l'eau qui précipite les matières albuminoïdes et contient en dissolution les acides-aminés.

La fraction butyreuse est analysée : on sépare l'hyalinol par évaporation de la masse et la matière grasse restante est d'abord soumise à l'acétone bouillant, puis dissoute dans l'éther ; une nouvelle évaporation donne un mélange cireux, de la cire et une matière grasse.

(1) C'est dans ce mémoire que nous avons trouvé la plupart de nos renseignements sur l'acido-résistance, surtout en ce qui concerne les théories sur les causes de la propriété.

« Le mélange cireux semble formé d'un peu de phosphatide accompagné d'une petite quantité d'un produit sulfuré inconnu et d'une cire qui serait constituée par des stéarates et des palmitates de mykol et d'un autre alcool à poids moléculaire élevé. Le mykol semblerait exister à l'état libre.

La cire est formée en grande partie d'acide laurique et de mykol, semblable à celui isolé par Sakae Tamura.

La matière grasse est constituée par des acides gras libres, et en particulier de l'acide oléique, des glycérides, des acides butyrique, caproïque, oléique, palmitique, stéarique et arachidique. Il y a probablement de l'acide crotonique et isocrotonique provenant de la saponification de l'hyalinol. »

Goris pense qu'une matière plus générale que l'acido-résistance est dûe principalement à des substances lipoïdes qui imprègnent le B. de koch, parmi lesquelles des acides gras libres, surtout les cires, avec l'alcool libre provenant de la saponification de cette cire et qui est le mykol.

3° — *Acido-résistance due à une substance indéterminée*

Le problème de l'acido-résistance n'ayant pas été résolu d'une façon satisfaisante en 1902, Grimme passe alors en revue toutes les opinions émises jusque là et constate que le *bacille de Timothée* possède la réaction de coloration, que celle-ci procède d'une substance à propriétés définies : soluble dans HCl, elle se distingue des graisses qui, par ailleurs ne sont pas acido-résistantes ; elle n'est pas une albumine puisque les fermentations la respectent : ce qu'elle a de commun avec les corps gras c'est qu'elle est soluble dans l'alcool à 80°, dans l'éther, dans le xylol. Elle est détruite par l'eau de Javel.

Ciaccio confirme les résultats de Camus et Pagniez en ce qui concerne l'acido-résistance, mais il retrouve la propriété dans les corps de Russel, chez certains éléments végétaux, dans la membrane qui entoure les globules adipeux du lait, dans l'acide benzoïque.

L'auteur ne croit pas que l'acido-résistance du bacille tuberculeux, est due à ses acides gras, parce que le Bacille de Koch

acido-résistant, ne se colore pas par les couleurs basiques d'aniline diluées comme les acides gras (Test. de Jacobson) et les bacilles dégraissés se colorent très bien par le Ziehl, la coloration résistant aux acides : des lamelles renfermant des bacilles sont plongées pendant une heure dans l'alcool-éther, 8 heures dans le xylol et une demie-heure dans l'alcool obsolu pour enlever le xylol ; dans ces conditions le Soudan III ne révèle pas de corps gras alors que le microbe est encore acido-résistant.

Enfin, selon L.-P. Paolo, l'acido-résistance n'est pas seulement engendrée par la présence de graisse autour du bacille, car elle ne disparaît pas après traitement des microbes par le xylène et le chloroforme ; elle n'est pas causée non plus par l'existence de graisse dans la cellule bactérienne puisque les bacilles épuisés par le xylène et par le chloroforme, puis soumis à l'action de l'acide osmique, ne présentent pas de parties noires. L'auteur croit que c'est une propriété non spécifique, mais plus ou moins définitivement acquise, comparable peut-être à certaines modifications des cellules dans la dégénérescence graisseuse.

4° — *Acido-résistance due à plusieurs substances*

Seuls, J. Auclair et L. Paris ont saisi une certaine complexité dans l'acido-résistance qui ne serait pas déterminée par une seule substance.

Ces auteurs entreprennent en 1907 l'étude de la constitution chimique du bacille tuberculeux. Ils inaugurent une technique dont le principe fut repris plus tard par Machebœuf et ses élèves : Ils opèrent sur le microbe, une extraction pour ainsi dire fractionnée des corps gras, après laquelle on est en droit de penser que le bacille est complètement délipidé. Sur 8 gr. 180 de bacilles, ils font agir successivement dans un appareil Soxhlet ou dans un agitateur à billes :

1° L'éther de pétrole qui dissout 0 gr. 945, soit 11,552 pour cent de la masse bactérienne ;

2° L'alcool qui dissout 0 gr. 467, soit 5,708 pour cent de la masse bactérienne ;

3° L'éther qui dissout 1 gr. 125, soit 14.975 pour cent de la masse bactérienne ;

4° Le chloroforme qui dissout 0 gr. 130, soit 1,594 pour cent de la masse bactérienne.

Au total : 2 gr. 767, soit 33,829 pour cent de la masse bactérienne.

Après ces opérations, le protoplasma demeure acido-résistant, fait déjà signalé par Behring au Congrès de la tuberculose en 1905, la matière unissante de la zooglye est faiblement acido-résistante, et en cela les auteurs sont d'accord avec Strauss. Jusque là on avait pensé que l'acido-résistance était une réaction spécifique des seules matières adipo-cireuses. « Cette opinion, universellement admise, ne repose sur aucun fondement », écrivent Auclair et Paris ; selon eux « l'acido-résistance n'est pas fonction des seules matières adipo-cireuses, mais appartient en propre, à des degrés divers, à toutes les parties constitutives du B. de Koch ». Ils ont, de plus, montré que la matière unissante est de nature hydrocellulosique, fixant ainsi la place nosologique du bacille tuberculeux, la cellulose étant l'un des éléments essentiels qui distinguent la cellule végétale de la cellule animale. Depuis ces travaux, cette donnée est désormais acquise et Goris la rappelait encore en 1920 : « On ne doit pas perdre de vue, en effet, écrivait-il, que ce microbe est un organisme végétal et que son étude peut être abordée comme celle d'une plante cryptogame ou phanérogame ». Au point du phytochimiste, bien entendu.

B. — Genèse du substratum de l'acido-résistance.

Diverses observations ont montré que l'acido-résistance est absente chez les jeunes et les vieux bacilles, qu'elle est modifiée par la composition, la richesse et le p.H. des milieux de culture. Paolo pense que l'acido-résistance est le témoin d'une

dégénérescence au niveau du microbe qui est cultivé dans un milieu rendu dysgénésique par la suppression de telle ou telle substance indispensable. Cette opinion aurait de la valeur si elle ne concernait que les microbes adultes ; mais pourrait-on expliquer de la même façon, l'absence de l'acido-résistance chez les jeunes bacilles ? Il semble également que la dégénérescence des microbes se traduit par des modifications de l'acido-résistance, par un aspect particulier du protoplasme bactérien plutôt que par l'absence complète de la propriété.

Aronson croit que la cire qu'il a isolée est un produit de sécrétion qui exsude à la surface du bacille. Pour Benès, le revêtement gras des mycobactéries, est formé par un processus physique et chimique aux dépens des lipides du milieu. Il avait réussi, en effet, à entourer artificiellement d'une membrane acido-résistante des microbes variés ; il avait vu que certains hyphomycètes (*Penicillium*) donnent également des graisses acido-résistantes, de même les styoptocoques en symbiose avec *oïdium lactis*.

Après de nombreuses recherches sur les acido-résistants, P. Lombardo Pellgrino cultive des *Streptothrix* dans du beurre stérile et leur découvre la propriété d'acido-résistance. Il pense que dans ces conditions, la résistance aux acides n'est pas due à l'adhésion de la graisse au protoplasme des microbes ni à sa pénétration dans le protoplasme bactérien ; elle est due à une matière grasse spéciale qui se forme par des poussées de métaplasie dans le protoplasma de la cellule bactérienne.

En somme, quelles que soient les divergences, la genèse du substratum de l'acido-résistance est rattachée au métabolisme des matières grasses du microbe.

En effet, toutes les recherches qui ont été entreprises pour connaître les variations de l'acido-résistance ont montré que la propriété est très fortement influencée par la composition du milieu ; pour qu'elle soit maintenue, il faut que le microbe dispose au moins d'un des composants des corps gras, la glycérine. A partir de cette substance prélevée du milieu de cul-

ture, le bacille effectue ses synthèses. Cette opinion est assez forte si on considère que l'acido-résistance varie parallèlement avec les processus d'assimilation et de désassimilation : absente, chez le jeune bacille, elle caractérise le microbe adulte et elle disparaît chez le vieux microbe. Enfin les causes mêmes de variation de la propriété prouvent que celle-ci est directement influencée par le métabolisme. Toutes les causes qui s'opposent aux transformations anaboliques et cataboliques, modifient l'acido-résistance dans le même genre. Ce sont : l'acidité du milieu ; sa pauvreté, etc. Ce n'était là qu'un petit point à préciser avant d'entreprendre la discussion des théories.

C. — *Discussion des résultats*

On vient de voir l'exposé nécessairement abrégé des théories et des recherches qui ont pour but l'explication de l'acido-résistance. Ce qui frappe de prime abord, c'est surtout leur grand nombre, et par cela même leur confusion, c'est ensuite leur impuissance à éclairer intégralement le problème. Chacune a pris à partie une substance donnée pour prouver généralement qu'elle est douée de l'acido-résistance, et ainsi, chaque théorie, si elle n'était pas exclusive, apporterait un argument à l'édifice. On a remarqué également les interprétations souvent contradictoires, émises à propos de certains points essentiels, et basées sur des expériences qui, à première vue, semblent inattaquables. Voyons donc ce que l'on peut reprocher aux unes et aux autres, sans oublier de mentionner le mérite qu'on doit reconnaître à chacune d'elles.

Les théories physiques ont d'abord fait intervenir l'imperméabilité de la membrane bacillaire, et on se rappelle de quelle façon Ziehl a écarté cette affirmation. On a invoqué ensuite la perméabilité de cette même membrane ; il est bien évident que la perméabilité est nécessaire pour que le microbe et son protoplasma puissent être colorés. Car chez les bactéries acido-résistantes la coloration n'intéresse pas seulement le revêtement superficiel du micro-organisme ; on peut se

rendre compte que le protoplasma est coloré aussi, de même les granulations de Much. Mais si la perméabilité de la membrane est une condition *sine qua non* de la colorabilité de ma mycobactérie, elle n'est pas une condition suffisante. La Bactéridie charbonneuse possède bien une capsule qui est perméable aux couleurs et ce microbe n'est pas acido-résistant. Donc, d'autres causes interviennent pour que l'acido-résistance existe.

Plus récemment encore Sordelli et Arena accusent les variations de la perméabilité de la membrane qui sont influencées par les variations du p.H. de la fuchsine, elles-mêmes conditionnées par un apport d'acide d'abord, par l'enlèvement ensuite de cet acide grâce à l'eau de lavage. A l'appui de leur thèse, les auteurs apportent un certain nombre d'arguments. Si des colonies de bacilles, fixées au Zenker ou au formol à 20 pour cent, sont incluses dans la paraffine et débitées en coupes de 2μ , les bacilles entiers sont encore acido-résistants alors que la propriété disparaît chez ceux qui sont sectionnés. Il faut aussi que l'acide agisse après la fuchsine, car, « si des bacilles fixés par la chaleur sont traités par l'acide nitrique à 25 pour cent pendant 5, 10, 20 minutes, ce traitement n'empêche point leur coloration et ne modifie point l'acido-résistance ». D'ailleurs, si on crée artificiellement une bactérie acido-résistante en plaçant à l'intérieur d'un sac de cellophane (qui figure la coque adipo-cireuse), une lame porte objet sur laquelle ont été fixés des microbes non acido-résistants, comme le B. d'Eberth par exemple, on se rend mieux compte des phénomènes.

Cette théorie, l'une des dernière en date, pour ne pas dire la dernière (7 juin 1934), rejette en bloc toutes celles qui la précèdent. Elle ne nous explique pas pourquoi les substances grasses qui ont été extraites du bacille tuberculeux se montrent acido-résistantes ; on ne peut pas dans ce cas faire intervenir la perméabilité d'une membrane qui n'existe plus, devant favoriser avec l'alcalinité de la fuchsine, la création d'un courant

en somme endosmotique, et se fermant quand la fuchsine devient acide. Car, dans le cas des corps gras du bacille de Koch, ces substances ont été prélevées du protoplasma microbien sous la forme de solution, par des liquides qui sont, en quelque sorte, leurs dissolvants spécifiques. On est encore bien moins fondé à invoquer l'existence d'un substratum albuminoïdique qui fixe d'abord la fuchsine avant de l'abandonner, fixation qui semble être un temps important de la préparation. Nous montrerons plus loin, au cours de nos recherches expérimentales que la combinaison fuchsine acide sulfurique est si énergique que même la soude en intervenant, ne libère pas la matière colorante.

Des bacilles coupés ne se montrent plus acido-résistants ; ce n'est pas parce que le protoplasma d'abord, la membrane ensuite ne retiennent plus la fuchsine qui s'échappe par la section et qui est entraînée pendant la décoloration et par le lavage consécutif. La section peut supprimer l'acido-résistance parce que les bacilles coupés ne présentent plus toute la surface de leur membrane pour absorber la matière colorante : il faudrait donc prolonger les temps de coloration pour que toutes les proportions soient gardées. Les bacilles coupés ne sont pas acido-résistants surtout parce qu'ils ont subi une manipulation mécanique. On a déjà vu dans les causes de la variation de l'acido-résistance qu'un simple broyage suffit, à plus forte raison une section qui ne respecte plus l'intégrité de la membrane.

Quant à la bactérie artificielle, les auteurs ne concluent pas d'une façon claire. Il faut croire, pour la justesse de leur démonstration, que le sac de cellophane est resté coloré en rouge malgré l'action des acides, alors que le bacille typhique n'a fixé que le bleu de méthylène. Cette expérience tendait à prouver que la cellophane est acido-résistante (ce qu'on ne savait pas encore), tandis que le B. d'Eberth ne l'est pas, ce que l'on savait depuis longtemps.

Les théories chimiques, elles, se sont édifiées sur des expé-

riences qui ont consisté, pour la plupart d'entre elles, dans l'analyse des extraits gras totaux des microbes tués, car les exigences de la coloration ne nous permettent pas de nous rendre compte de l'existence de l'acido-résistance chez les microbes vivants. Donc, toute conclusion portant sur la virulence, sur le pouvoir pathogène et ayant pour point de départ l'étude des propriétés tinctoriales chez la mycobactérie tuée, doit contenir au moins cette réserve.

L'histoire de l'acido-résistance est curieuse, car elle s'accomplit par étapes, avec des vicissitudes diverses, et, suivant les pays, la substance cause de la propriété varie. C'est ainsi qu'en Allemagne, en dehors de quelques tentatives pour habiliter les alcools, on a toujours pensé que les cires sont responsables de la résistance à la décoloration par les acides. En France, au contraire, avant et à partir de 1907, jusqu'en 1934, l'unanimité s'était faite sur le rôle des corps gras, accusés en bloc, malgré certains résultats divergents. Depuis les travaux de Machebœuf et de ses collaborateurs, personne ne doute plus que seules les cires, existant dans la gangue des bacilles acido-résistants, n'engendrent la réaction de coloration.

Mais il y a des contradictions fondamentales qui doivent être relevées. Klebs, le premier, constate que les bacilles dégraissés perdent leur acido-résistance et son opinion est confirmée par les recherches de Babès et Cantacuzène, de Vallée, de Roux et Borrel. Par contre Ruppel, Bulloch et Macleod, Auclair et Paris, Ciacco ont vu que l'épuisement du bacille tuberculeux, si poussé soit-il, n'enlève pas complètement l'acido-résistance.

Ces divergences s'expliquent si on considère en premier lieu que les auteurs n'ont pas employé le même matériel, nous voulons dire une souche de même origine ; ils n'ont pas employé les mêmes dissolvants, ni dans le même ordre.

Mais la grande cause de la contradiction dans les résultats provient de ce que les chercheurs n'ont pas soumis le bacille tuberculeux aux mêmes manipulations, aux mêmes conditions d'expérience. « Les extractions se font le plus souvent en

milieu neutre ; cependant quelques auteurs ajoutent parfois de l'acide au solvant (Aronson), mais cette addition modifie la nature de la matière grasse », constate Goris. C'est là une des causes, mais elle ne suffirait pas à expliquer que des auteurs (Roux et Borrel, Vallée, etc...), ayant soumis le bacille tuberculeux à l'action d'un seul solvant aient vu l'acido-résistance disparaître à la suite de ce traitement alors que d'autres, Auclair et Paris, par exemple, effectuent une série d'épuisements avec des solvants différents et ne parviennent pas à détruire la propriété.

Tous les solvants n'ont pas la même valeur. Frouin croit qu'on pourrait les classer ainsi par ordre croissant de pouvoir dissolvant : acétone, chloroforme, éther, alcool absolu. L'éther de pétrole, s'il faut en croire Goris, « quelles que soient les conditions physiques de son action, se présente comme le dissolvant le moins énergique ». Aussi, en ce qui concerne les résultats indiqués par Vallée, Goris, formule-t-il cette réserve : on peut favoriser la dissolution par la division des masses bacillaires, mais on ne saurait rendre soluble dans l'éther de pétrole des substances qui ne le sont pas.

Par contre Goris prône l'action du chloroforme qui peut dissoudre des quantités énormes de corps gras, pouvant atteindre 40 pour cent du poids des bacilles secs mis en œuvre. Dans une opération préliminaire, 165 gr. de bacilles secs ont donné 65 gr. de substances solubles dans le chloroforme, soit 38,18 pour cent et dans une seconde opération, 1,180 gr. de bacilles secs ont fournis 450 gr. d'extrait gras, soit 38,13 pour cent de ces mêmes substances.

Donc tous les auteurs qui ont soumis le bacille de Koch à l'action d'un seul solvant, notamment les solvants faibles comme l'acétone, l'éther de pétrole, le xylène et même l'alcool méthylique devraient conclure à la persistance de l'acido-résistance. S'ils ont eu des résultats contraires, c'est qu'ils ont négligé certaines conditions qui font varier l'acido-résistance et qu'ils ont fait intervenir un autre élément, la chaleur, dont l'action est double.

La chaleur fait fondre les corps gras et les fait parvenir à l'état liquide ou à un état voisin ; ce nouvel état en les libérant de certaines combinaisons ou de certains substratum auxquels ils étaient liés par des forces physiques, purement adhésives, facilite leur solution et peut-être même augmente leur solubilité dans les dissolvants habituels. C'est ainsi que l'alcool agissant à chaud après l'acétone est capable de dissoudre des substances qu'il est obligé d'abandonner à froid et qui, par conséquent, précipitent (Machebœuf et ses collaborateurs).

La chaleur peut encore intervenir directement sur le protoplasme microbien et altérer ses propriétés. Babès et Cantacuzène tuent les bacilles tuberculeux par la chaleur et les épuisent ensuite par l'alcool méthylique et par l'éther de pétrole. L'acido-résistance est perdue en 48 heures. L'action des dissolvants des corps gras a été trop courte pour qu'on puisse leur imputer la disparition de l'acido-résistance. Mieux que cela, Roux et Borrel ont mis en contact des bacilles avec une solution faible d'HCl portée à l'ébullition, ou bien ils ont remplacé cette action préalable par celle du four à flamber porté à 140-150°, et tout cela à titre de préparation ; ils ont soumis ensuite le microbe ainsi traité à une série d'épuisements par du zylène bouillant. Aussi n'est-on point surpris que l'acido-résistance soit perdue après ces manipulations dont chacune, prolongée, devrait faire aboutir au résultat trouvé. D'après les indications de Spehl, la chaleur à 140°, pendant une heure suffit pour enlever l'acido-résistance.

Quant au procédé d'agitation préconisé par Vallée, l'acido-résistance disparaît non par suite d'une délipidation intégrale du microbe par l'éther de pétrole, mais parce qu'on supprime l'agencement des molécules et l'intégrité du protoplasme.

La méthode qui, incontestablement donne le plus de garantie, c'est l'extraction par fractionnement qui utilise le pouvoir dissolvant différent de divers liquides employés et qui, à des températures relativement basses, donne des résultats indiscutables. Les solvants, agissant les uns après les autres, dissol-

vent, chacun à leur tour, une partie des substances respectées par le solvant précédent dont l'action correspondrait à une sorte de décapage, un dégrossissement préalable si l'on peut dire de ce bloc complexe de corps gras constitué par l'enveloppe du bacille tuberculeux. Ce rôle est bien tenu par l'acétone et l'éther de pétrole qui fixent notamment les substances cireuses. Les solutions obtenues de la sorte ont une saturation plus forte en corps gras dissous. On trouvera un exemple dans les travaux d'Auclair et Paris qui estiment avoir complètement délipidé le bacille tuberculeux après traitement successif à l'alcool, l'éther et le chloroforme. Ils ont précisé la notion de la spécificité des dissolvants vis-à-vis des corps gras dissous : L'alcool dissout la matière colorante qui est une luthéïne, des acides gras et des substances alcaloïdiques ; l'éther fixe les graisses neutres et une substance analogue à la cholestérine ; le chloroforme enlève une partie de cette substance et des matières cireuses.

Machebœuf, dans ses récentes recherches, fait agir sur le B. de Koch vivant de l'acétone et extrait ainsi 17, 20 pour cent de la masse microbienne. Le meilleur solvant ensuite, qui respecte les liquides phosphorés, c'est l'éther qui emporte 2,20 pour cent de la masse bacillaire. L'alcool méthylique dissout à son tour 2,05 pour cent. Après cette triple extraction à froid, intervient une série d'épuisements à chaud, car il restait, fixés sur le protoplasme, les liquides qui sont le substratum du pouvoir haptène et de l'acido-résistance. L'alcool éthylique bouillant enlève 2,35 pour cent de substances solubles à froid. Le benzène, l'ébullition, dissout enfin 0,34 pour cent.

Seulement, ce qui diminue la force probante des expériences rapportées, c'est que très rares sont les auteurs qui ont pensé soumettre les bacilles tuberculeux dégraissés à l'épreuve de contrôle par les réactifs des corps gras, pour se rendre compte si effectivement la délipidation est complète. Lombardo Pell Paolo a employé l'acide osmique et Ciacco a contrôlé par le Soudan III ; dans les deux cas, ces auteurs ont trouvé que le bacille complètement dégraissé conserve l'acido-résistance. Et

les expériences d'Auclair et Paris, si démonstratives soient-elles ont manqué de cette garantie qui est capitale.

L'analyse chimique a révélé, en outre, l'existence d'acides gras à un taux très élevé, ce qui a conduit certains à penser qu'ils pouvaient être la cause de l'acido-résistance. Il n'est pas contestable qu'en présence de la fuchsine, un acide gras puisse donner en somme un savonnate qui résiste à une décoloration (il faut comprendre une décomposition) ultérieure par $\text{SO}^4 \text{H}^2$.

Mais à propos des acides gras, se pose une question qu'on ne peut pas éluder : Les acides gras existent-ils à l'état de liberté au niveau du bacille tuberculeux vivant, ou bien proviennent-ils de la désintégration des matières grasses par suite des processus auxquels on soumet le B. de Koch pour le tuer ou tout simplement pour le fixer ?

De tels acides gras ne peuvent exister qu'au niveau des microbes morts. En effet, comment pourrions-nous concevoir la présence d'acides gras libres dans l'intimité d'une cellule vivante et quel rôle leur assignerions-nous dans le chimisme des bactéries ? On pourrait admettre comme une possibilité, l'existence de sels acides parce que tous les ions ^+H du polyacide qui les a formés n'ont pas été saturés, comme dans le cas de $\text{PO}^4 \text{Na H}^2$ ou parce que résultant de la combinaison d'un acide fort et d'une base faible, comme par exemple NO^3) ^2Bi . Mais ce n'est pas le cas des acides gras ; les milieux organiques sont en général basiques à l'état normal, les protoplasmes le sont, de même les bactéries.

Or Camus et Pagniez ont trouvé, après expériences, que les acides gras sont acido-résistants et que leur injection donne des lésions semblables à celles de la tuberculose. Ils en concluent que « les acides gras libres existent au niveau du bacille tuberculeux vivant dans l'organisme et que les propriétés acido-résistantes qui servent à le différencier lui sont données par les mêmes acides gras ».

Si cette conception était conforme à la vérité, si l'acido-

résistance et la virulence du microbe avaient la même origine — la présence d'acides gras non combinés dans le stroma bacillaire — la maladie clinique ne serait plus en dernière analyse qu'une acidose d'un certain genre, et comme telle, justifiable de la réserve alcaline du sang, et, à son défaut, d'une médication basique. La thérapeutique antituberculeuse, par les moyens qu'elle met en œuvre, ne semble pas se conformer à cette conception.

Si Camus et Pagniez avaient raison, comment pourrait-on expliquer ce paradoxe, qu'il existe quelques bacilles acido-résistants pathogènes, qu'il en est bon nombre saprophytes, alors que tous possèdent la substance virulente, les acides gras libres, qui leur confèrent précisément à tous la propriété d'être acido-résistants ? Les acides gras qui se trouvent chez les uns et les autres seraient-ils si différents quant à leurs propriétés pharmacodynamiques alors qu'ils aboutissent tous au même résultat histochimique, l'acido-résistance conférée au microbe ? Les expériences des auteurs semblent donner la même virulence à tous les acides gras. Mais l'expérience, ici, n'a pas dû tenir compte des contingences de la clinique ; au laboratoire on a inoculé des doses massives (0 gr. 10 à 0 gr. 40) d'acide gras, en plus grande quantité certainement que ne pourraient en libérer tous les bacilles tuberculeux d'un organisme infecté. D'autre part, on ne devrait pas s'étonner que des acides couramment qualifiés de faibles parce que déplaçables de leurs sels par tous les autres acides, puissent déterminer des lésions lorsqu'ils sont inoculés à l'état de pureté. De l'aveu des auteurs « l'injection des acides gras sous la peau donne lieu à des lésions irritatives très marquées, aboutissant en quelques heures à une réaction d'inflammation localisée, bientôt suivie de la production d'escarres et d'ulcérations torpides à cicatrisation lente » ; à plus forte raison l'injection, chez le chien et le lapin, dans un tissu aussi fragile que le poumon ! Dans certains cas, il y eut des morts chez les sujets d'expérience par congestion ou par œdème du poumon. Même l'acide acétique, à l'état de pureté, est corro-

sif ; au contact avec un tissu d'une sensibilité exquise, mais qui ne se défend pas (les alvéoles pulmonaires), l'acide a dû déterminer des lésions. Ce sont, dans un premier temps la congestion qui, si elle n'emporte pas le sujet, est suivie de splénisation et d'hépathisation ; dans un deuxième temps, on note des lésions ulcéreuses et caséuses.

Les injections d'acide gras ont déterminé tout simplement une broncho-pneumonie traumatique, dont l'agent traumatisant est un agent chimique. Le foyer réagit par la congestion, puis par la splénisation ; l'hépathisation est une organisation fibrineuse de l'exudat plasmatique dans l'alvéole ; l'ulcère correspond à l'élimination d'un foyer non organisé de micro-bronchite ; la caséification est le témoin de l'évolution de l'alvéolite vers une nécrose aseptique, surtout des fibres élastiques.

Ces lésions observées sont bien dues à l'acide, mais elles ne peuvent être mises en parallèle avec celles de la tuberculose qui comportent en outre des altérations des ganglions correspondants, et tout autre acide, pourvu qu'il soit concentré, déterminerait de semblables lésions. Elles traduisent, au contraire, des modes de réaction qui n'appartiennent qu'au parenchyme pulmonaire, et ceci, en raison de sa constitution anato-histologique, de sa vascularisation et de son rôle fonctionnel.

Bien avant les recherches de Camus et Pagniez, Borrel qui avait connu les résultats d'Auclair en ce qui concerne la chloroformo-bacilline et l'éthéro-bacilline, faisait remarquer que « les bacilles acido-résistants, très différents par leur action pathogène, peuvent fournir des poisons gras du même ordre. L'auteur indiquait une lacune et formulait un souhait en même temps : « On n'a pas, jusqu'ici, écrivait-il, signalé de différence au point de vue de la teneur en matière grasse, entre le bacille de Koch très virulent et un bacille de Koch dépourvu de virulence. Des travaux entrepris dans cette direction auraient un intérêt de premier ordre, s'il était démontré

que la virulence du bacille est liée à la présence ou à l'absence de tel ou tel élément gras ». Ce vœu a été comblé par Von Schweinitz et Dorset dont les recherches ont montré que la teneur en graisse du bacille tuberculeux va en croissant dans la série animale : bacille du bœuf, bacille du porc, bacille de l'homme, bacille du cheval, bacille des oiseaux ; qu'un bacille humain atténué est plus riche en graisse qu'un bacille virulent.

En réalité, si les graisses neutres du bacille tuberculeux se sont montrées douées de quelques propriétés pharmacodynamiques et lésionnelles, c'est qu'elles le doivent aux matières toxiques (endo et exotoxines) qui, adsorbées à elles au point de former de véritables *lipo-toxines*, ont été extraites du microbe en même temps que le corps gras par le solvant employé. C'est aussi l'avis de Goris qui écrivait ceci : « On ne peut même pas dire si cette activité (action tuberculisante des extraits éthérés et chloroformiques) est bien due à une substance de nature lipidique, car les lipides ont pu, au cours de leur dissolution, entraîner un composé qui, pris isolément, ne se dissoudrait pas dans l'éther ou dans le chloroforme. Les entraînements sont fréquents lorsqu'on prépare des extraits au moyen des solvants des graisses. Les solutions ont l'aspect *colloïdal* qui fait penser à la présence de corps autres que les glycérides et les cires. Il est même difficile d'obtenir des filtrats absolument dépourvus de corps microbiens. » Goris a dit le mot : les substances toxiques sont des albumines et leur solution est colloïdale. Enfin, pour se rendre compte de la partie toxique des corps gras bacillaires, il semblerait qu'il suffise de les soumettre à la chaleur avant de rechercher leurs propriétés. Mais la taxine tuberculeuse est peu sensible à la chaleur (Calmette) et la préparation de la tuberculine le prouve largement.

Il faudrait préférer alors l'action du formol qui, de toute évidence, n'altérant pas la composition chimique, ne doit pas modifier la tonicité des corps gras, si toutefois ces substances

en étaient pourvues. Les récents travaux de Machebœuf et de ses collaborateurs viennent confirmer en partie notre point de vue : le maximum d'acido-résistance et de pouvoir haptène ne coexistent dans les mêmes éléments gras et là où l'une se révèle intense, l'autre ne se montre pas du tout ; le contraire existe également.

Le dernier argument à invoquer, c'est que, selon Vallée, « les bacilles dégraissés qui ont complètement perdu l'acido-résistance se montrent selon les cultures employées et leur âge, plus ou moins toxiques. Repris par centrifugation, débarrassés de toutes traces d'éther de pétrole, ils se comportent chez les sujets tuberculeux (bœuf et cobaye) comme une *tuberculine hyperactive* ». Ce point de vue est confirmé par L. Martin et A. Vaudremer qui ont obtenu des bacilles dégraissés plus toxigènes encore que ceux de Vallée, l'augmentation de toxicité résidant dans le mode de préparation et l'origine de la souche, car les bacilles bovins sont moins toxiques que les bacilles humains. C'est aussi l'avis exprimé par Cantacuzène et Irimescu au Congrès de la Tuberculose en 1901.

Donc rien n'autorise à affirmer l'existence d'acides gras libres au niveau du bacille tuberculeux vivant ; en est-il de même chez le microbe tué ? Si on se reporte uniquement aux analyses qui ont été faites, on pourrait encore nier leur présence. En effet, les chercheurs, par des dissolvants appropriés, ont réussi à isoler divers corps gras ; pour pénétrer leur constitution intime ils les ont saponifiés, c'est-à-dire qu'ils ont démoli l'édifice moléculaire pour isoler les divers composants et chacun d'accuser l'un ou l'autre de ces composants d'être la cause de l'acido-résistance. Divers auteurs, notamment Goris et Anderson ont isolé une quantité considérable d'acides gras du bacille tuberculeux, ce qui montre la complexité des graisses bacillaires. Si les acides gras sont signalés par un seul auteur, d'autres viennent confirmer leur existence. Parmi ces acides gras, certains se trouvent dans les corps gras végétaux, comme les acides caproïques, oléïques, stéariques, palmitiques, arachidiques, lauriques, linoléïques ; d'autres sont

d'origine animale comme l'acide butyrique du beurre et l'acide cérotique de la cire ; d'autres enfin sont particuliers au B. K. comme l'acide hexaiosanique, l'acide tuberculos-téarique, l'acide phtioïque.

Mais si on suit les diverses étapes de l'action de la chaleur, si on essaye de surprendre ce qui se passe au niveau du microbe on arrive à admettre qu'il puisse sortir des acides gras à l'état de liberté. « Il est incontestable, écrit Goris, qu'un traitement aussi brutal que celui employé pour tuer le bacille peut conduire à des modifications importantes de la constitution chimique du protoplasma et chez les matières grasses...

C'est ainsi que Frouin et Mlle Guillaume pensent que le microbe fabrique des graisses neutres et que celles-ci s'altèrent à l'air et encore plus au cours du chauffage à 120° nécessaire pour tuer le bacille. Ils trouvent que la matière grasse extraite par les solvants, ne contiendrait pas d'acides gras libres alors que tous les auteurs sont d'accord pour lui trouver un indice d'acidité assez élevé. »

Ce sont ces modifications chimiques que nous allons tenter de reconstituer. La coloration exige, pour se faire, une fixation préalable du microbe. Dans cette opération, on passe à la flamme d'un bec Bunsen, pendant une très courte durée, des bacilles étalés en couches minces. Que peut-il résulter de cette fixation ?

D'abord certains corps gras peuvent être décomposés sur le champ en raison de la haute température et libérer leurs acides gras. Mais ce qui est incontestable, c'est que les albumines sont coagulées. Or la coagulation n'est pas toujours seulement un changement d'état physique ; elle s'accompagne aussi de profondes altérations chimiques. Les albumines renfermant des acides aminés du groupe de la cystine, vont mettre en liberté leur acide sulfhydrique, d'autres albumines en raison du p.H. alcalin du protoplasma détachent des acides aminés entiers. Par conséquent, après la désintégration de ces albumines, le milieu du microbe devient acide, réalisant ainsi une

condition favorable pour la décomposition des corps gras. La chaleur agissant de nouveau, provoque une véritable saponification acide, avec mise en liberté des acides gras et des alcools. Si ce processus n'intéresse pas la totalité des graisses microbiennes, il doit exister en partie : cette acidité du protoplasme nous expliquerait alors pourquoi il se laisse colorer par la fuchsine basique alors que la fuchsine acide ne s'y fixe pas.

Divers expérimentateurs ont montré que les acides gras sont acido-résistants (Camus et Pagniez, Ciacco), que des alcools supérieurs le sont (Sakae Tamura), mais que les corps gras neutres ne le sont pas (Camus et Pagniez, Grimme).

Un acide gras peut-il être acido-résistant ? La combinaison d'un acide, quel qu'il soit avec la fuchsine, n'est pas une impossibilité chimique. La fuchsine est le chlorhydrate de la rosaniline et contient encore dans sa molécule, deux radicaux aminés susceptibles d'être saturés par autant de groupements acides. Resterait à connaître les propriétés du savon organique né de la combinaison de la fuchsine et d'un acide gras.

L'autre partie des corps gras, les alcools, peuvent-ils aussi se montrer acido-résistants ? Le trialcool, fréquemment rencontré dans les corps gras usuels, la glycérine, ne l'est pas. Du reste les lois de la chimie seule, ne permettent pas de prévoir une combinaison entre la glycérine et le chlorhydrate de rosaniline. On a isolé du bacille tuberculeux, des alcools supérieurs, à poids moléculaire élevé, le mykol, de formule $C^{29}H^{56}O$, un mélange d'alcool cérylique $C^{27}H^{45}O$, et d'alcool mycrique $C^{30}H^{62}O$ (Aronson), tous alcools qui, à la coloration, fixent si énergiquement le Ziehl qu'ils ne l'abandonnent pas malgré l'intervention de réactifs décolorants. Mais des alcools de la série de la cholestérine proprement dite, l'ischolestérine et la phytostérine, ne se montrent pas acido-résistants bien qu'on les ait isolés du bacille tuberculeux. L'hyalinol isolé par Goris, n'est pas non plus acido-résistant.

Il faut remarquer que les alcools malgré leur faible affinité pour les bases, peuvent réagir devant ces corps, s'ils sont à

l'état métallique : on connaît les sels (alcoolates) de l'alcool éthylique dont la structure moléculaire est moins complexe que celle des alcools isolés du B. K. La glycérine trialcool ne réagit pas ; il se peut que le processus réactionnel se poursuive avec l'élévation du poids et la complexité moléculaires parallèlement aussi avec la réduction du nombre des fonctions alcools.

Machebœuf et ses collaborateurs, après bien d'autres, ont trouvé que l'acido-résistance est engendrée par les cires bacillaires. Bulloch et Macleod, notamment, avaient dégraissé le bacille tuberculeux par l'alcool méthylique et ils avaient vu que l'extrait méthylique filtré à chaud, abandonne en refroidissant un précipité acido-résistant. Machebœuf a épuisé le microbe tué, par l'alcool éthylique chaud, qui, en refroidissant abandonne une cire C. Celle-ci a été purifiée pour donner successivement C³ et φ^1 . Voilà la contribution nouvelle qu'ils apportent, mais en disant que l'acido-résistance est due à une cire, ils laissent l'impression que c'est une opinion de plus versée dans le débat. Du reste, le but de leurs recherches, n'était pas de déterminer la substance cause de la propriété tinctoriale des mycobactéries ; ils l'avaient prise, cette propriété, comme un repère, au même titre que le pouvoir haptène, pour guider leurs recherches ; aussi la découverte de la cérique C³ φ^1 n'est-elle que la vérification d'un test, mais on ignore la destinée du microbe. On ne sait pas si, après la préparation de la tuberculine, le microbe avait conservé l'acido-résistance. On ignore notamment au cours de quelle fraction le bacille n'a plus l'acido-résistance (s'il l'avait primitivement), on ne connaît pas non plus les indications fournies par les réactifs des corps gras sur le protoplasme microbien au cours de l'épuisement, à travers les fractionnements.

Ces auteurs ont répété leurs expériences sur des bacilles vivants et apportent encore moins de renseignements. La cire peut être acido-résistante en raison des corps gras qui entrent dans sa composition et en raison du substratum fourni à ces corps par l'insaponifiable ; la cire seule n'explique pas toute l'acido-résistance des mycobactéries.

Donc, la théorie de l'acido-résistance due à une cire ne doit pas être plus exclusive que les autres. La seule conclusion que Machebœuf et ses collaborateurs peuvent tirer de leurs travaux, c'est que la céride extraite du bacille tuberculeux tué, par l'alcool chaud après l'action de l'acétone, est acido-résistante, de même le lipide enlevé à chaud à des bacilles au préalable dégraissés à l'état vivant par l'acétone, puis par l'éther et l'alcool méthylique, ces trois dissolvants agissant à froid.

L'analyse chimique a également incriminé les matières protéiques. L'un des nombreux caractères des albumines, c'est d'être amphotères. Dans ces conditions, une combinaison, serait possible entre la fuchsine, même acide et les albumines, à la condition que les radicaux aminés de la fuchsine soient encore libres de toute combinaison. Le corps né de cette combinaison, peut prendre certaines propriétés des albumines, notamment de donner des solutions colloïdales ; sa stabilité et sa résistance à la décomposition par les acides sont renforcées par le phénomène de l'adsorption et par les forces cohésives qui naissent dans le sein des micelles en réaction.

Après nous être entouré, de la part de notre Maître, M. le Professeur E. Nicolas, de tous les renseignements, que nous désirions avoir en ce qui concerne la chimie, nous avons tenté d'expliquer l'acido-résistance.

TROISIEME PARTIE

Expérimentation et essai d'explication du phénomène de l'acido-résistance

Nous avons vu qu'aucun auteur n'a expliqué d'une façon suffisante, la cause de l'acido-résistance. Diverses substances (albumines, acides gras, alcools, corps gras) isolés du bacille tuberculeux, sont douées de l'acido-résistance. Rien ne semble empêcher que le complexe formé par la réunion de toutes ces substances, ne se montre également acido-résistant.

Si la ou les substances responsables de la propriété, ne sont pas jusqu'ici explicitement connues, on peut néanmoins fixer dès maintenant certaines conditions d'apparition de la propriété et par cela même deviner son explication. L'ensemble de ces conditions d'ailleurs, peut préjuger du processus de la coloration dont le stade principal est une réaction chimique.

1° L'acido-résistance existe chez les mycobactéries, c'est-à-dire des bacilles pourvus d'une capsule adipo-cireuse. Dès qu'on les a manipulés (section, broyage), la propriété disparaît, ce qui semble prouver qu'elle est en rapport avec un certain agencement des diverses parties de la cellule, ou que tout au moins elle est conditionnée par l'intégrité de la bactérie.

D'autre part Auclair et Paris en dégraissant le B. K., ont dû respecter les propriétés chimiques du protoplasme ; à cette seule condition, ils ont pu indiquer les résultats déjà exposés ; l'acido-résistance est donc liée à la réactivité chimique du protoplasme.

2° Le chauffage intense empêche l'apparition de la propriété chez des bactéries normalement acido-résistantes. Par conséquent, ou bien la chaleur détruit la ou les substances responsables de l'acido-résistance (substances thermolabiles) ou bien elle modifie les propriétés physiques et surtout chimi-

ques du protoplasme, ce qui entraîne dans les deux cas la disparition de la propriété.

3° La coloration obtenue se modifie avec le temps. On pourrait en inférer qu'il se forme entre le substratum de l'acido-résistance et la matière colorante une combinaison stable, puisqu'elle résiste à $\text{SO}^4 \text{H}^2$, mais sensibles à l'oxydation lente, progressive et continue de l'atmosphère.

Ces trois points notés doivent amener certaines réflexions.

Ne semble-t-il pas paradoxal qu'une combinaison stable à l'épreuve de l'acide soit néanmoins détruite par suite d'un apport d'oxygène ? C'est que dans les deux cas, l'action de l'agent qui intervient, est différente. La combinaison fuchsine + acide gras, donne un savon ; celui-ci forme un enduit autour de la bactérie, abaisse la tension superficielle selon toute évidence et l'empêche de mouiller, par conséquent de réagir. Quant à ce savon lui-même, il est inactif vis-à-vis de $\text{SO}^4 \text{H}^2$ qui a plutôt tendance à détacher les composants pour s'unir à la partie basique.

Mais l'oxygène ne provoque pas une décomposition aussi brutale, elle s'attaque plutôt aux parties fragiles de la molécule, à l'endroit des doubles liaisons pour donner un peroxyde. De sorte que finalement le savon est formé par un peroxyde d'acide gras, fixé sur la matière colorante. La nouvelle combinaison est forcément instable en raison de l'instabilité du peroxyde lui-même qui quitte en entier le composé ; son action ne s'arrête pas là, puisqu'il perd son oxygène et oxyde en même temps le colorant libéré à partir du savon : par ce processus, nous expliquerons plus loin les modifications de la coloration.

Nous n'avons pas besoin, pour l'avoir déjà fait, d'insister sur l'influence du chauffage. La chaleur enlève la propriété chez le microbe acido-résistant. Ce caractère témoigne que la chaleur opère sur le substratum, des modifications d'ordre plutôt chimique que physique, puisque la fixation de la matière colorante par le protoplasme microbien en est empê-

chée. Or les substances sensibles à ce point à la température sont les matières albuminoïdes. On peut donc penser qu'elles constituent le substratum de l'acido-résistance.

Mais ce qui semble avoir échappé jusqu'ici aux divers chercheurs aussi bien bactériologistes que chimistes, ce sont les divers temps de la coloration qui n'ont pas été considérés en eux-mêmes.

Or, dans la technique de Ziehl, il y a deux étapes primordiales qui doivent être dissociées :

a) Fixation de la matière colorante par le protoplasme du microbe ;

b) Résistance à la décoloration par les acides.

En ce qui concerne le premier point, il n'existe aucun doute puisque la fuchsine est un colorant non vital et qu'elle teint diverses substances. On connaît notamment tous les microbes Gram-négatifs, dont le protoplasme retient à froid la fuchsine qui n'est même pas mordancée dans ce cas. Cette fixation ne semble pas être en rapport avec une constitution spéciale du microbe, mais avec les affinités chimiques des protéines protoplasmiques. Là où réside la discussion, c'est dans le second point. A savoir : pourquoi la fuchsine qui peut être fixée par tous les protoplasmes, teint certains d'entre eux avec tant d'énergie que la coloration résiste aux acides. Ici, intervient un autre élément, les lipoïdes qui permettent à l'acido-résistance de se manifester et qui sont spéciales aux mycobactéries au point d'en former un groupe à part. Et, ce qui différencie précisément les microbes gram-négatifs des bactéries acido-résistantes, tous microbes susceptibles de se colorer par la fuchsine, c'est que les premiers sont dépourvus de la coque ciro-adipeuse des seconds. Du reste, il suffit de créer artificiellement une coque grasseuse autour d'un microbe gram-négatif comme le colibacille ou le bacille pestueux, ou même gram-positif comme la bactériodie charbonneuse pour voir l'acido-résistance se révéler (Paolo, Denes). Cela prouverait

que les corps gras, par leur présence au niveau du microbe, permettent la fixation énergique de la matière colorante par des bactéries qui, auparavant ne se coloraient pas par la fuchsine, ou qui, colorées par cette substance ne la gardaient pas.

Pour préciser le rôle exact des corps gras, nous nous sommes livrés à des recherches de deux sortes :

1° Sur l'acido-résistance ;

2° Sur la modification de la coloration par l'oxydation.

I. — Recherches sur l'acido-résistance

Miller a décrit une expérience d'une grande simplicité, pouvant être reproduite indéfiniment avec le même succès puisqu'elle relève de la chimie. Il verse dans une solution diluée de fuchsine basique une quantité convenable d'acide oléique ; celui-ci, après agitation du mélange, viendra se rassembler à la surface en prenant une coloration magenta sombre, alors que le reste du tube demeure incolore. Il se sera formé un oléate aux dépens de la totalité de la fuchsine.

Nous avons voulu répéter cette expérience avec des corps gras entiers, sans en espérer beaucoup de résultats d'ailleurs, car Camus et Pagniez d'une part, Grimme d'autre part, nous avaient appris que les huiles, les graisses ne sont acido-résistantes que lorsqu'elles sont rances.

Nous avons par conséquent opéré soit sur des huiles à l'état naturel frais, soit sur ces mêmes huiles additionnées de quelques gouttes d'une dilution d'acide. Nous avons d'abord fortement agité la portion acidulée de façon à créer une émulsion instable ; nous l'avons soumise ensuite au chauffage intense d'un bec de Bunsen dont le trou d'aération était complètement ouvert. Nous avons espéré de la sorte saponifier une partie tout au moins du corps gras et libérer les acides gras dont on a affirmé que la présence est nécessaire pour que l'acido-résistance soit. Donc, dans le tube où ils se trouveraient, la réaction devrait être plus franche. Nous aimons mieux dire que les huiles acidulées dans ces conditions réagissent moins que les huiles vierges et que souvent elles ne réagissent pas du tout. Serait-ce parce que l'acide, au lieu de favoriser la saponification, a plutôt acidifié la fuchsine, l'empêchant ainsi de colorer le corps gras ? Il semble que cette suggestion n'est pas à retenir, car l'acide ajouté sous la forme

de quelques gouttes de sa dilution, n'est pas en quantité suffisante pour saturer la fuchsine qui est déjà en excès par rapport au corps gras.

Nous avons fait en somme des Ziehl in vitro, avec quatre huiles végétales et deux corps gras animaux ; nous avons complété les expériences dans des tubes par des recherches sur lames et sur papier filtre. Enfin, nous nous sommes toujours servi des réactifs ordinaires de la coloration : fuchsine basique de Ziehl, $\text{SO}^4 \text{H}^2$ à 20 pour cent, l'alcool à 95, l'eau distillée.

1° — EXPÉRIENCES SUR LES HUILES VÉGÉTALES.

Recherches avec l'huile d'olive

A) Huile naturelle.

I. — *Fixation* : L'huile est chauffée dans un tube d'une façon énergique et discontinue.

II. — *Coloration* : On ajoute un excès de fuchsine. A froid, on observe la simple superposition des deux liquides, l'huile occupant la partie supérieure, et sans aucune modification de coloration.

Après un chauffage doux et prolongé, la même superposition persiste, mais la partie huileuse prend une teinte rosée, alors que la partie inférieure (fuchsine) ne modifie en rien la densité de sa coloration.

Cette partie supérieure est prélevée, mise en présence d'acide osmique, elle ne change pas, même après une forte agitation. Si on chauffe, on ne note aucune réaction appréciable, l'acide osmique, par suite de sa densité, se déposant au fond du tube. Donc, à partir de ce moment, le corps gras a été modifié et le complexe corps gras + matière colorante s'éclaircit après l'action de l'acide osmique à chaud en prenant une coloration de vin légèrement coupé d'eau.

III. — *Décoloration* : On opère sur les deux portions : supérieure (huile rose) et inférieure (fuchsine). Si on ajoute $\text{SO}^4 \text{H}^2$ en excès la même superposition persiste, avec de lé-

gères modifications. Le corps gras surnageant reste rose, alors que la partie inférieure (fuchsine) de rouge vineuse qu'elle était, devient jaune safran.

On isole donc la portion supérieure et la met en présence d'un excès d'alcool : l'alcool surnage et se colore en rose lilas, tandis que le corps gras précipite sous la forme de fines granules rougeâtres. On décante l'alcool qu'on remplace par de l'eau ; celle-ci prend une teinte rose alors que le corps gras, congloméré et solide, le surnage et devient rouge brique.

B) Huile acidulée.

I. — *Essai de saponification* : L'huile d'olive est additionnée de quelques gouttes de $\text{SO}^4 \text{H}^2$; on agite et on chauffe fortement. Au refroidissement, l'huile est encore un peu trouble, puis elle devient plus claire que la normale comme si l'acide avait enlevé le pigment colorant. La goutte d'acide occupe le fond du tube.

II. — *Coloration*. — On ajoute de la fuchsine en excès et on chauffe doucement. L'huile surnage sans être colorée ; inférieurement se trouve le complexe fuchsine + acide qui est plus clair que la fuchsine seule, comme s'il y avait à la fois dilution et dissolution. Le corps gras n'étant pas coloré, nous n'avons pas poussé la réaction plus loin.

Recherches avec l'huile de lin cuite

A) Huile naturelle.

I. — *Fixation* : Chauffage énergique et discontinu.

II. — *Coloration* : On ajoute de la fuchsine en excès. A froid, on constate même après agitation, que les deux liquides restent superposés, la fuchsine étant en position inférieure. Si on chauffe doucement les deux liquides prennent une teinte rouge vineux uniforme au point qu'on ne les distingue plus. Peu de temps après la partie supérieure a une couleur plus foncée, semblable à celle de la fuchsine primitive. En nous basant sur la couleur, nous admettons que c'est la fuchsine qui se trouve en haut, mais si notre hypothèse était exacte, il

y aurait alors inversion des couches par inversion des densités, et cela après le chauffage. Or ce n'est pas une possibilité car la solution de fuchsine étant plus lourde que les corps gras, elle ne peut donner avec ces substances une combinaison dont le poids spécifique soit supérieur au sien.

Néanmoins, nous prélevons la couche inférieure dont la coloration se rapproche le plus de l'huile de lin cuite. En présence d'acide osmique, la coloration se fonce, devient fortement rouge vineux, presque noir. Le liquide, vu sur une faible épaisseur, montre un précipité semblable à de petits grains noirs dans le sein d'un liquide noir bléuté.

Le liquide initial (couche inférieure) est soumis à l'action de $\text{SO}^4 \text{H}^2$. Une coloration jaune safran apparaît dans tout le tube dont le contenu est limpide. Serait-ce là une combinaison fuchsine + $\text{SO}^4 \text{H}^2$, ce qui est possible, ou bien le produit de la combustion d'un corps organique par cet acide, ce qui est encore possible car $\text{SO}^4 \text{H}^2$ réduit le saccharose en carbone.

L'addition d'un excès d'alcool au liquide jaune safran, fait apparaître trois couches :

- a) Une couche supérieure, faiblement colorée en rose ;
- b) Une couche moyenne rose intense qui semble être formée par l'alcool ;
- c) Une couche inférieure semblable au liquide primitif (jaune safran).

On prélève la couche supérieure et on la met en présence d'eau. Il se forme alors deux zones : l'une supérieure, rose pâle, l'autre inférieure, violacée avec une transparence rose et constituée par de l'eau.

Nous savons depuis que ces réactions sont celles de la fuchsine : si on l'additionne d'acide osmique, la couche rouge vineux devient plus foncée, tirant sur le noir, sans qu'il soit possible de déceler microscopiquement la présence d'un précipité dans le sein du liquide ; l'addition de $\text{SO}^4 \text{H}^2$ à la fuchsine donne une solution jaune safran qui, en présence d'alcool, devient rose violacée dans la partie supérieure, en

contact avec l'alcool. L'agitation fait disparaître la superposition des couches et donne une couleur lilas uniforme. On a l'impression que la fuchsine et $\text{SO}^4 \text{H}^2$ donnent une sorte de leucodérivée (on ne peut pas dire exactement leucodérivée puisque la combinaison n'est pas incolore) et l'alcool agissant par la suite, fait apparaître une coloration un peu différente de celle de la fuchsine primitive. Il semble donc que la décoloration par l'alcool est nécessaire, après l'action de l'acide si on veut faire un bon Ziehl.

Nous avons, par conséquent, repris toute cette expérience par suite de l'erreur d'interprétation des couches, que nous avons faite après action de la fuchsine sur l'huile de lin. Cette erreur s'explique par la grande affinité de l'huile pour la fuchsine, affinité que nous ne pouvions pas soupçonner.

Nous avons donc dans notre tube de l'huile et de la fuchsine. Le tout est chauffé et en haut, nous avons une couche rouge vineux que nous prélevons.

En présence d'acide osmique, cette couche donne un précipité noir en suspension dans de la fuchsine qui est devenue grasse, onctueuse, adhérant aux parois du tube, et elle teint le verre en rose violacé.

On fait agir un excès de $\text{SO}^4 \text{H}^2$ et on voit apparaître deux couches :

a) inférieurement, l'acide, qui est jaune pâle;

b) La couche supérficielle est formée par le corps gras coloré dont la teinte se fonce. On ajoute un excès d'alcool : il se forme une solution rose violette foncée. L'addition d'eau donne une coloration violette mêlée de blanc et le corps gras surnage, coloré en rouge vineux.

B) Huile acidulée.

I. — *Essai de saponification* : L'huile de lin cuite et additionnée de quelques gouttes de $\text{SO}^4 \text{H}^2$; on chauffe d'une façon énergique mais discontinue. On voit apparaître alors trois couches : la couche supérieure rappelle une émulsion huileuse,

la couche inférieure est formée par la goutte d'acide et la couche moyenne représente une suspension dans de la matière grasse.

II. — *Coloration* : On ajoute de la fuchsine en excès, on soumet à un chauffage doux et on observe la superposition de 4 couches ainsi réparties du haut en bas du tube :

1° Une couche superficielle rose;

2° Un précipité caillebotté blanc, contenant entre ses caillots des particules rouge franc d'aspect gras;

3° Une combinaison fuschine + Acide ;

4° Un dépôt blanchâtre.

III) *Décoloration* : On prélève les deux premières couches et on les met en présence d'un excès de SO^4H^2 . Deux plages se forment alors :

a) Une plage inférieure, jaune comme de l'huile d'arachide par exemple, donc moins colorée que l'huile de lin cuite. L'acide osmique d'ailleurs donne avec ce corps un précipité noir formé par des granulations noires en suspension dans le sein d'un liquide noir bleuté : c'est là également la réaction de l'huile primitive non manipulée.

b) Une plage supérieure. Celle-ci est prélevée et on ajoute de l'alcool en excès : l'alcool rose violacé, est en région supérieure, alors que dans le fond du tube se dépose un précipité rouge brique d'aspect gras. On décante l'alcool qu'on remplace par de l'eau : celle-ci prend une teinte blanc laiteuse et le corps gras conserve sa coloration.

Recherches avec l'huile de lin crue

A) Huile naturelle :

I. — *Fixation* : L'huile subit un chauffage énergique et discontinu.

II. — *Coloration* : On ajoute de la fuchsine en excès. A froid, on ne constate que la simple superposition des deux liquides. Après un chauffage doux, on observe que les deux couches

prend une teinte lilas, cependant qu'un précipité rouge et gras se dépose au fond du tube.

B) Huile acidulée.

I. — *Essai de saponification* : On ajoute quelques gouttes de $\text{SO}^4 \text{H}^2$ et on chauffe fortement. L'huile se divise en deux parties dont la supérieure semble être une émulsion.

II. — *Coloration* : On met un excès de fuchsine et on soumet à un chauffage doux. Les deux parties sont maintenues, la partie inférieure ressemble à de la fuchsine dont elle a les réactions.

La partie supérieure donne avec l'acide osmique un précipité noir.

III. — *Décoloration* : On prélève la partie supérieure. Par $\text{SO}^4 \text{H}^2$ il se forme deux couches : une, inférieure, limpide, formée par l'acide, et une supérieure qui est le corps gras un peu décoloré présentant une teinte rouge lavé.

On enlève l'acide et on met de l'alcool qui fait apparaître une coloration violette. Si on décante et qu'on lave le précipité à l'eau, il devient blanc.

Recherches avec de l'huile d'arachide.

A) Huile naturelle.

I. — *Fixation* : Chauffage intense et discontinu.

II. — *Coloration* : On ajoute de la fuschine en excès. A froid, les deux liquides restent superposés sans modifier leur coloration; après chauffage les deux liquides se présentent avec les caractères suivants :

1° Couche inférieure formée de fuschine dont elle présente les réactions vis-à-vis de l'acide osmique et de $\text{SO}^4 \text{H}^2$ et alcool.

2° Couche supérieure qui simule une émulsion; la coloration est moins rouge que celle donnée par l'huile de ricin au même temps de coloration. Par l'acide osmique, on a un précipité noir au sein d'un liquide huileux.

III. — *Décoloration* : La couche supérieure est prélevée et mise en contact avec un excès de SO^4H^2 . Il se forme alors deux zones :

a) Une zone supérieure, constituée par le bloc de corps gras légèrement coloré en rouge brique.

b) Une zone inférieure limpide et incolore, formée par l'acide.

Sans décanner l'acide, on ajoute de l'alcool qui surnage els deux zones et contient en suspension, des globules gras très légèrement colorés, qui tendent à la dissolution. La plage moyenne est formée par le restant du corps gras et la plage inférieure est constituée par l'acide. Tout le tube est incolore, on ajoute de l'eau : l'acide et l'alcool se mélangent à l'eau, le corps surnage incolore.

B) Huile acidulée.

I. — *Essai de saponification*. L'huile d'arachide est additionnée de quelques gouttes de SO^4H^2 , puis on chauffe fortement : l'huile surnage la goutte d'acide.

II. — *Coloration* : On ajoute de la fuschine en excès et on chauffe doucement. Aucune modification ne se produit et le corps gras n'absorbe pas la fuschine. Il donne avec l'acide osmique, non un précipité, mais une coloration noire.

La couche inférieure est formée par la fuschine diluée.

III. — *Décoloration* : Ce temps est inutile, puisque le corps gras n'est pas coloré par la fuschine. SO^4H^2 le fait prendre en masse, l'alcool le dissout après agitation et l'eau le fait surnager à l'état solide.

2° — EXPÉRIENCES AVEC LES CORPS GRAS ANIMAUX.

Recherches avec de l'huile de foie de morue

A) Huile naturelle.

I. — *Fixation* : L'huile subit un chauffage énergique et discontinu : de longs flocons blancs précipitent.

II. — *Coloration* : On ajoute un excès de fuchsine. A froid,

on n'observe que la superposition des deux liquides. Après chauffage, cette superposition prend des caractères particuliers :

1° La couche supérieure est rose, elle contient en suspension des particules blanchâtres. Elle est formée par le corps gras et se montre basique au papier de tournesol. L'acide osmique donne un précipité noir.

2° La couche inférieure est formée par la fuchsine dont elle présente les réactions avec l'acide osmique.

III. — *Décoloration* : On prélève la couche supérieure et on ajoute un excès de SO^4H^2 . Il se forme deux zones : une inférieure, limpide, incolore, constituée par l'acide; et une supérieure, colorée, comme la liqueur primitive en rose.

On ajoute de l'alcool qui occupe la partie supérieure du tube et qui se teint légèrement en rose. Au fond, se dépose un précipité rouge brique. L'alcool décanté, le précipité est repris par l'eau qui se teint légèrement alors que le corps gras sur-nage entièrement décoloré.

B) Huile de foie de morue acidulée.

I. — *Essai de saponification* : On chauffe énergiquement avec discontinuité, l'huile acidulée par quelques gouttes de SO^4H^2 . Il se forme un abondant précipité blanc, filamenteux, qui reste en suspension dans la masse du corps gras.

II. — *Coloration* : On ajoute de la fuchsine en excès et on chauffe doucement. On constate l'existence de trois couches superposées :

1° La couche superficielle est jaune, huileuse, moins colorée que l'huile d'arachide ordinaire, semblable à l'huile d'olive. Par l'acide osmique, cette couche donne une coloration noire.

2° La couche moyenne est formée par un abondant précipité qui constitue un ménisque épais, moiré, bistre foncé, détachant dans le liquide supérieur, quelques parcelles et un torrillon central pour former dans le corps gras, une véritable suspension. L'acide osmique donne ici encore, une coloration noire.

3° La couche inférieure semble formée de fuchsine pure dont elle a la couleur et la réaction devant l'acide osmique.

III. — *Décoloration* : La couche moyenne, qui a une coloration particulière, est prélevée ; soumise à l'action d'un excès de $\text{SO}^4 \text{H}^2$, elle donne une solution safran, comme ferait la fuchsine. Cette solution safran, additionnée d'un excès d'alcool, laisse apparaître à la partie supérieure du tube, une coloration violette, alors que dans le fond, on retrouve la liqueur primitive régénérée. L'agitation provoque la formation d'une teinte uniforme à la solution limpide. L'addition d'eau ne fait que diluer la masse sans rien précipiter.

Recherches avec la graisse de veau

A) Graisse seule.

Le tissu adipeux, débité en petits morceaux, et mis dans des tubes qui sont placés dans un bain-marie et qui, au bout de la fusion de la graisse, sont chauffés directement à la flamme d'un Bunsen. On prélève la partie liquide.

I. — *Fixation* : Chauffage énergique, discontinu : le corps gras prend une teinte plus foncée.

II. — *Coloration* : Après un refroidissement considérable, contrôlé sur les parois du tube, on ajoute un excès de fuchsine. A froid il se forme deux couches, le corps gras surnageant la fuchsine sans être coloré par elle. Après agitation, la superposition persiste, mais le corps gras est d'un rouge artériel qui tranche bien avec le rouge sang veineux de la fuchsine.

Le tube est chauffé et assez longtemps, car le corps gras se prend vite en masse. Les deux couches persistent durant ce chauffage et la couche supérieure éclaircit sa teinte au point de prendre l'apparence de sérum fortement hémolysé.

La couche inférieure est formée de fuchsine seule (couleur, réaction à l'acide osmique). La couche supérieure, en présence d'acide osmique, donne un précipité noir dans le sein d'un liquide rouge violacé : c'est en somme une réaction combinée de la fuchsine et des corps gras.

on n'observe que la superposition des deux liquides. Après chauffage, cette superposition prend des caractères particuliers :

1° La couche supérieure est rose, elle contient en suspension des particules blanchâtres. Elle est formée par le corps gras et se montre basique au papier de tournesol. L'acide osmique donne un précipité noir.

2° La couche inférieure est formée par la fuchsine dont elle présente les réactions avec l'acide osmique.

III. — *Décoloration* : On prélève la couche supérieure et on ajoute un excès de SO^4H^2 . Il se forme deux zones : une inférieure, limpide, incolore, constituée par l'acide; et une supérieure, colorée, comme la liqueur primitive en rose.

On ajoute de l'alcool qui occupe la partie supérieure du tube et qui se teint légèrement en rose. Au fond, se dépose un précipité rouge brique. L'alcool décanté, le précipité est repris par l'eau qui se teint légèrement alors que le corps gras sur-nage entièrement décoloré.

B) Huile de foie de morue acidulée.

I. — *Essai de saponification* : On chauffe énergiquement avec discontinuité, l'huile acidulée par quelques gouttes de SO^4H^2 . Il se forme un abondant précipité blanc, filamenteux, qui reste en suspension dans la masse du corps gras.

II. — *Coloration* : On ajoute de la fuchsine en excès et on chauffe doucement. On constate l'existence de trois couches superposées :

1° La couche superficielle est jaune, huileuse, moins colorée que l'huile d'arachide ordinaire, semblable à l'huile d'olive. Par l'acide osmique, cette couche donne une coloration noire.

2° La couche moyenne est formée par un abondant précipité qui constitue un ménisque épais, moiré, bistre foncé, détachant dans le liquide supérieur, quelques parcelles et un torrillon central pour former dans le corps gras, une véritable suspension. L'acide osmique donne ici encore, une coloration noire.

3° La couche inférieure semble formée de fuchsine pure dont elle a la couleur et la réaction devant l'acide osmique.

III. — *Décoloration* : La couche moyenne, qui a une coloration particulière, est prélevée ; soumise à l'action d'un excès de $\text{SO}^4 \text{H}^2$, elle donne une solution safran, comme ferait la fuchsine. Cette solution safran, additionnée d'un excès d'alcool, laisse apparaître à la partie supérieure du tube, une coloration violette, alors que dans le fond, on retrouve la liqueur primitive régénérée. L'agitation provoque la formation d'une teinte uniforme à la solution limpide. L'addition d'eau ne fait que diluer la masse sans rien précipiter.

Recherches avec la graisse de veau

A) Graisse seule.

Le tissu adipeux, débité en petits morceaux, et mis dans des tubes qui sont placés dans un bain-marie et qui, au bout de la fusion de la graisse, sont chauffés directement à la flamme d'un Bunsen. On prélève la partie liquide.

I. — *Fixation* : Chauffage énergique, discontinu : le corps gras prend une teinte plus foncée.

II. — *Coloration* : Après un refroidissement considérable, contrôlé sur les parois du tube, on ajoute un excès de fuchsine. A froid il se forme deux couches, le corps gras surnageant la fuchsine sans être coloré par elle. Après agitation, la superposition persiste, mais le corps gras est d'un rouge artériel qui tranche bien avec le rouge sang veineux de la fuchsine.

Le tube est chauffé et assez longtemps, car le corps gras se prend vite en masse. Les deux couches persistent durant ce chauffage et la couche supérieure éclaircit sa teinte au point de prendre l'apparence de sérum fortement hémolysé.

La couche inférieure est formée de fuchsine seule (couleur, réaction à l'acide osmique). La couche supérieure, en présence d'acide osmique, donne un précipité noir dans le sein d'un liquide rouge violacé : c'est en somme une réaction combinée de la fuchsine et des corps gras.

III. — *Décoloration* : La couche superficielle (sérum hémolysé), prélevée, est mise en présence d'un excès de $\text{SO}^4 \text{H}^2$. La graisse se prend immédiatement en masse par le passage de l'acide. On chauffe doucement et le corps gras surnage sous la forme d'une boule rose. On enlève l'acide et on le remplace par l'alcool : Le corps gras surnage encore avec une teinte rose violacée, l'alcool étant lui aussi légèrement coloré. C'est la première fois que nous observons un corps gras surnageant l'alcool.

B) Graisse acidulée.

I. — *Essai de saponification*. — On ajoute quelques gouttes de $\text{SO}^4 \text{H}^2$ et on agite jusqu'à la formation d'une émulsion blanche. Cette émulsion instable, disparaît au repos : l'acide se dépose au fond du tube en entraînant les albumines coagulées.

II. — *Coloration*. — Un excès de fuchsine traverse en biais le corps gras qui se prend en masse au contact du colorant froid. Le niveau de la fuchsine dépasse celle du corps gras immergé qui reste collé aux parois. On soumet le tout à un chauffage doux et prolongé. Il se forme deux couches ; la couche inférieure obéit à la réaction osmique de la fuchsine dont elle a la couleur. La couche supérieure est jaune citron teinté de rouge. Cette couche, au bout d'une demi-heure, est encore liquide. Par l'acide osmique, elle donne un précipité noir.

III. — *Décoloration*. — En présence d'un excès de $\text{SO}^4 \text{H}^2$, la couche supérieure donne un corps gras qui se prend en masse dans le sein de l'acide en se fixant à la paroi du verre. Un doux chauffage le libère et en fait une boule solide de graisse qui surnage l'acide. Nous n'avons pas insisté davantage.

Bien que l'accumulation des preuves ne soit pas un inconvénient, nous n'avons pas voulu multiplier indéfiniment des expériences dont nous n'espérons pas tirer de plus amples renseignements. Nous nous sommes surtout attaché, comme

on a pu le voir, à enregistrer les teintes obtenues sans nous inquiéter des intermédiaires possibles, formés au cours de la réaction et dont la détermination exacte incomberait plutôt à un chimiste.

On peut noter, malgré les affirmations contraires, que les huiles naturelles neutres sont acido-résistantes, mais qu'elles le sont faiblement. Une tentative préalable de saponification acide s'oppose à la manifestation de la propriété.

Toutes les huiles ne possèdent pas l'acido-résistance au même degré ; on pourrait les ranger ainsi par ordre d'intensité décroissante : huile de lin (l'huile cuite d'abord, puis l'huile crue), l'huile de ricin, l'huile d'olive, l'huile d'arachide. On peut même dire que cette dernière n'est pas du tout acido-résistante. On peut affirmer que l'huile de foie de morue, est totalement dépourvue de l'acido-résistance, tandis que la graisse de veau, colorée, résiste à la décoloration.

Au cours de nos expériences, nous avons vu que dans la plupart des cas, le corps gras se combinait avec la fuchsine, que le corps obtenu, ne réagissait pas toujours en présence d'acide osmique ou que, s'il réagissait, il donnait alors une réaction mixte tenant à la fois et de celle des corps gras et de celle de la fuchsine. Ce n'est donc pas une combinaison au sens chimique du mot, où chacun des composants perd ses réactions spécifiques, mais un composé physique.

Nous avons remarqué aussi qu'en fin de manipulation, le corps liquide au début, se présentait assez souvent sous une forme solide, ayant un aspect de graisse et fortement diminué dans sa masse ; en se conglomerant, il surnage l'acide et ne se laisse pas mouiller ou pénétrer par lui.

Nous avons été amenés également à apprécier la valeur exacte de nos réactifs : fuchsine, acide et alcool.

En ce qui concerne la fuchsine, il faut se souvenir de sa formule :

Fuchsine rubine	1 gr.
Acide phénique neigeux cristallisé	5 gr.
Eau distillée	100 cc.

Cette fuchsine, dite de Ziehl, est basique alors qu'elle devrait être acide, puisque sa solution contient de l'acide phénique en une proportion cinq fois supérieure à celle de la fuchsine elle-même. Or, la fuchsine acide ne colore pas les bacilles acido résistants.

Il faut observer que l'acide phénique dont la formule est C^6H^5OH , porte mal son nom ; on l'appelle encore acide carbonique ; c'est le phénol ordinaire, c'est en somme l'alcool tertiaire du benzène. Pour qu'il devienne un acide, il lui faudrait en posséder la fonction : $COOH$. L'acide correspondant existe : c'est l'acide benzoïque C^6H^5COOH .

On a été amené à donner au phénol le nom d'acide, parce qu'il a plus de propriété acide que l'alcool éthylique, par exemple, alcool comme lui-même cependant. Pour obtenir un alcoolate, il faut faire agir l'alcool éthylique sur le métal alcalin, tandis que le phénol agit sur la base pour donner un phénate au même titre qu'un acide salifie une base. De là, est née l'erreur qui fait passer le phénol pour un acide. Dans la fuchsine de Ziehl, le phénol ne sert uniquement qu'au mordantage.

En second lieu, l'acide. Ce qui semble étonnant, c'est que des microbes morts possèdent une coque ciro-graisseuse, si résistante qu'une fois colorée, elle ne se laisse pas attaquer par un acide. En son temps, nous avons également rapporté les expériences de Sordelli et Arena qui soumettent le bacille tuberculeux mort à l'action de l'acide azotique dilué pendant des temps plus ou moins longs sans altérer sa colorabilité. Or, souvent, l'acide employé c'est l'acide sulfurique qui est le plus fort acide connu : mis en présence de saccharose, il le brûle et le transforme extemporanément en carbone. On connaît aussi les propriétés corrosives par déshydratation qu'il manifeste vis-à-vis du tissu vivant. Enfin, il se combine avec

l'eau dont il est très avide. La combinaison se fait avec contraction, donnant lieu à une réaction fortement exothermique qui témoigne encore de l'énergie de l'acide sulfurique.

On pourrait donc se montrer surpris qu'un pareil acide ne détruise pas à la coque des mycobactéries. Qu'on veuille bien se souvenir que l'acide employé comme réactif décolorant, est une dilution de 20 et au maximum de 25 pour cent. A cette concentration (dilution au 1/5) l'acide est encore capable de brûler la fibre de nos vêtements; mais il se comporte vis-à-vis des tissus organiques, comme un acide très faible, plus faible même que l'acide acétique pur. En aspirant du réactif décolorant dans une pipette Pasteur dont l'extrémité était brisée irrégulièrement, nous avons eu accidentellement un excès d'acide dans la bouche. Aucune brûlure ne s'en est suivie et le seul dommage que nous avons eu, ce fut un goût astringent qui n'a pas résisté au lavage à grande eau.

Donc l'acide sulfurique à 20 pour cent, a perdu les propriétés destructives reconnues au vitriol ; néanmoins, il semble encore capable à cette concentration, de brûler la fibre végétale ; mis en présence du fuchsine, il donne une solution safran. Mais en raison des propriétés fortement amoindries de l'acide dilué à 20 pour cent, on peut admettre non point une déshydratation brutale de la fuchsine (ce qui n'est d'ailleurs pas possible, la fuchsine n'étant pas un corps oxygéné), mais une combinaison que l'alcool est susceptible de dissocier pour faire sortir un corps colorant, ou plus certainement dont il extrait un colorant alcool-soluble. Du reste, si on fait agir SO^4H^2 sur du violet de gentiane par exemple, on obtient la même solution jaune safran. L'addition d'alcool fait apparaître les anneaux suivants : d'abord de l'alcool en surface, limpide, incolore ; puis l'alcool coloré en violet rose ; puis un anneau violet, puis un zône verte ; à la séparation de celle-ci et du liquide safran restant, un anneau jaune. L'addition de soude qui devrait ramener la fuchsine à l'état de solution alcoolique en fixant SO^4H^2 ne fait que diluer la solution qui devient d'un vert clair surmonté d'un anneau bleu.

Si on fait agir de l'alcool sur une dilution très faible de fuchsine dans de l'acide (addition d'acide jusqu'à la disparition de la teinte safran), on observe la formation d'un précipité blanc, incolore. L'addition de soude ne fait pas apparaître une coloration. Si on crée le liquide safran et qu'on ajoute immédiatement de la soude dans l'espoir de neutraliser SO^4H^2 , on n'obtient qu'une dilution. Il semble donc acquis que SO^4H^2 , agissant sur la fuchsine, donne une combinaison stable qui résiste à l'action de divers agents, notamment de la soude. L'alcool fait apparaître ce corps coloré et l'eau, *in vitro*, provoque sa dilution alors que sur un support solide, comme le papier par exemple, le même corps coloré en rose lilas apparaît. Nous avons donc un corps (combinaison de la fuchsine et de l'acide), qui semble être un leucodérivée, un peu coloré cependant, et dont nous pouvons prévoir la composition chimique.

En effet, en partant de la rosaniline, dérivé du tri-phényl méthane, cette substance possède trois noyaux amine dont l'un est saturé par HCl pour donner le chlorydrate qui est la fuchsine. Il reste donc deux radicaux susceptibles d'être saturés par un acide ; SO^4H^2 en se combinant avec la fuchsine donne un corps stable, qui résiste à l'action d'autres substances et qui serait en quelque sorte le chlorydro-sulfate de rosaniline.

D'un point de vue plus général, les sels d'un acide quelconque et de la fuchsine sont d'autant plus stables qu'ils sont de nature particulière : ces sels sont des composés par addition, l'acide se dédouble en ses ions électro-positifs et électro-négatifs qui s'ajoutent en entier à la fonction amine. La première conséquence c'est que l'azote de l'amine, de trivalent qu'il était devient pentavalent, le corps obtenu est saturé et sans réactivité marquée. La deuxième conséquence c'est que la fuchsine acide ne colore pas les bacilles acido-résistants parce que tous ses radicaux amine sont déjà saturés. La troisième et dernière conséquence, c'est que la fuchsine basique, une fois qu'elle est combinée avec les matières protéiques et

passées des mycobactéries, donne un corps qui résiste à l'action de l'acide par manque d'affinité. Cette dernière considération explique pourquoi dans le courant de nos expériences la soude n'a jamais libéré SO_4H^2 de sa combinaison avec la fuchsine, quelles que fussent les conditions.

Quant à l'alcool, notre troisième réactif, il fait réapparaître une couleur primitive qui avait disparu au cours de nos réactions : le fait n'est pas surprenant puisqu'il s'observe dans d'autres techniques de coloration. Dans la méthode de Gram, par exemple, après le violet de gentiane, on fait agir le lugol ; il apparaît, à ce moment, une coloration « d'un beau rouge mordoré », selon l'expression classique. Dès qu'on décolore par l'alcool-acétone ou par l'alcool seul, la coloration violette, qui avait disparu sous l'influence du réactif iodé, apparaît sur la lame avec une intensité accrue. Ici, on suppose la formation d'un composé chimique, résultat de la combinaison de l'iode sous toutes ses formes avec le violet de gentiane ; ce n'est pas un leucodérivé puisque le corps est coloré en rouge mordoré.

La récupération de la coloration primitive semble être une propriété non encore définie de l'alcool. Serait-ce tout simplement une dispersion du corps colorant que l'alcool extrait de ses combinaisons, ou bien serait-ce le témoignage de la formation d'une sorte de leucodérivée dont l'alcool met en évidence le résultat coloré ? La réponse semble résider dans l'un ou l'autre cas ou dans les deux à la fois suivant les circonstances. Il était intéressant de noter cette propriété de l'alcool.

En somme, jusqu'ici, nos recherches n'ont démontré qu'une chose, la faible acido-résistance des corps gras naturels.

3. — *Expériences sur papier filtre et sur lame*

Durant nos recherches sur les huiles, il nous a semblé que la faible acido-résistance observée était surtout imputable à l'absence de substratum solide. Nous avons vu bien des fois que les huiles nous donnaient en fin de réaction un corps gras solide, semblable à de la vaseline plus ou moins colorée ; nous

avons noté aussi la réduction de la masse comme si le corps gras avait été dissout en partie. Enfin, nous avons remarqué également une coloration assez intense du corps gras au début de la réaction, avant l'action de SO^4H^2 et une décoloration assez grande après l'action de l'acide qui n'était guère plus coloré que de nature ; l'alcool, au contraire se colorait beaucoup sans que le corps gras semble avoir perdu beaucoup de sa coloration. Nous avons été ainsi amené à donner un substratum solide à nos corps gras, ce qui nous rapprochait encore davantage des conditions naturelles. Nous avons donc adopté la technique de J. Camus et L. Pagniez en faisant la réaction sur un papier Laurent imprégné d'huile.

Une goutte d'huile est mise sur un carré de papier filtre placé sur une lame propre. On met sur la platine chauffante et le corps gras servant de préparation, on effectue un Ziehl complet. On chauffe fortement pour réaliser la fixation : la goutte d'huile imprègne davantage le papier, diffuse dans la masse et son étalement semble avoir diminué l'épaisseur du papier. On colore à chaud jusqu'à émission de vapeurs, on décolore ensuite. Voici nos résultats :

Huile d'olive : aucune réaction, tout le papier se décolore.

Huile de lin cuite : coloration très fortement fixée, noire violacée rappelant un peu celle des granulations de Much.

Huile de lin crue : coloration fixée avec énergie, rouge violacée.

Huile de foie de morue : coloration très bien fixée, intermédiaire entre celle donnée par l'huile de lin cuite et l'huile de lin crue.

Huile de ricin : la coloration apparaît comme une empreinte digitale rose violacée pas très accentuée.

Huile d'arachide : aucune réaction.

Tous ces résultats seraient prévisibles sauf en ce qui concerne l'huile de foie de morue. In vitro, cette huile a donné des réactions qu'on peut considérer, en pratique, comme négatives ; sur le papier, quand nous lui avons donné un support cellulosique, cette même huile animale a fixé la colora-

tion avec plus d'énergie que l'huile de lin crue. Or, pendant toutes nos recherches sur les substances grasses, l'huile de lin nous a paru, jusqu'ici, l'élément gras qui fixait le mieux la fuchsine. Cette fixation, du reste, était augmentée quand l'huile contenait des produits pyrogénés (huile de lin cuite). Ceci prouve que l'acido-résistance ne se manifeste qu'en présence de certains corps gras qui permettent à la fuchsine de se fixer sur le substratum solide, de quelque nature qu'il soit ; un chauffage préalable (fixation) favorise son apparition.

Par ailleurs, nous avons fait les mêmes réactions avec la graisse de veau et le saindoux. Les résultats ont été identiques dans les deux cas. Sur lame, après frottis et fixation, on colore suivant la technique de Ziehl. Microscopiquement, on observe que l'endroit occupé par le corps gras est le seul qui fixe le colorant, et qu'il est respecté par l'acide. L'acide ne mouille pas le corps gras et son contact avec la fuchsine fait apparaître la teinte safran. L'alcool donne ensuite la coloration rose violette.

Le microscope révèle une trame acido-résistante qui doit supporter les globules gras ; on voit aussi des traînées conjonctives peut-être colorées en violet. Elles ont dû être colorées par la fuchsine d'abord, se décolorer au contact de l'acide et se recolorer après l'action de l'alcool. On trouve enfin des parties sans doute dépourvues de corps gras, donc très exposées à l'action de l'acide : elles sont d'un noir brun comme si elles avaient subi une véritable combustion. Nous sommes allés chercher l'explication de ce que nous voyions dans le *Dictionnaire usuel des Sciences médicales*. A Dechambre, Mathias Duval et L. Lereboulet nous apprennent que « la fuchsine ou rouge d'aniline est employée en technique histologique pour colorer les éléments des tissus, qu'elle imprègne très rapidement. « Mais, il faut dire aussi, ajoutent-ils, qu'un léger lavage fait vite disparaître cette coloration excepté sur les fibres élastiques pour lesquelles la fuchsine constitue un véritable réactif spécial. On s'est servi aussi de la fuchsine pour colorer plus particulièrement les cils vibratiles et les

épithéliums ». Peut-être alors que la trame acido-résistante que nous avons observée était sans doute formée de fibres élastiques.

Sur le papier Laurent, le corps gras apparaît sous la forme d'une véritable empreinte digitale, rouge très foncé, entourée d'une zone claire qui la détache davantage.

En réparant notre erreur en ce qui concerne l'huile de lin cuite, nous avons mis en évidence l'action intermédiaire nécessaire du corps gras pour permettre la fixation énergétique du corps gras. Cette huile est additionnée d'un excès de fuchsine : il se forme deux couches, la fuchsine en bas, et en haut, l'huile un peu coloré. On bouche le tube avec le doigt et on renverse plusieurs fois. Quand on enlève le doigt, on constate qu'un vide relatif, témoin d'une certaine réaction à froid, s'est formé dans le tube. D'autre part le doigt est coloré par un mélange de fuchsine et de corps gras, qui, contrairement à l'habitude, s'enlève très facilement.

La couche huileuse teintée à froid après agitation, de même que l'huile chauffée avec de la fuchsine ont été mises sur du papier Laurent. Après chauffage, les 2 gouttes d'huile se sont répandues sur le papier en lui cédant leur coloration. SO^4H^2 a légèrement décoloré la tache du papier ayant reçu de l'huile colorée à froid, tandis que là où l'huile a été chauffée avec la fuchsine, l'acide a accentué la coloration en la rendant plus foncée. L'alcool agissant par la suite a donné une coloration rose au premier papier alors que dans le second, la tache était intégralement respectée avec la coloration que l'acide lui avait donnée. Le lavage à l'eau a montré dans le premier cas une tache rose et dans le second, une tache rose-violette.

Enfin, on a laissé séjourner le papier à l'huile chauffée dans SO^4H^2 pendant 2 heures au bout desquelles on a fait agir l'alcool : la tache était violet sombre.

Essai d'explication. — En conclusion, on peut tenter, à la lumière de nos connaissances, de reconstruire l'ordre successif des phénomènes dont l'aboutissement est la manifestation de l'acido-résistance.

Le bacille est fixé : son protoplasme a été le siège de profondes modifications qui le rendent apte à fixer la fuchsine basique. Les corps gras, notamment, se sont fondus pour diffuser dans la masse du bacille et certains d'entre eux se sont décomposés pour acidifier le stroma microbien.

On fait agir la fuchsine à la faveur d'une chaleur relativement faible que l'on arrête à la température d'évaporation du colorant. Cette fuchsine pénètre tout le microbe, se diffuse dans la masse et se combine aussi bien avec les albumines protoplasmiques qu'avec les graisses into et péricellulaires. La combinaison produite est stable grâce au mode d'action (addition) des acides sur la fuchsine.

On décolore par l'acide qui doit donner une coloration jaune safran par suite de la combustion de substances atteintes par $\text{SO}^4 \text{H}^2$. Celui-ci pénètre également dans le protoplasme et accentue la coloration des granulations de Much qui doivent contenir un acide gras de l'ordre de l'acide oléique ou linoléique. Mais, il faut le noter une fois de plus, $\text{SO}^4 \text{H}^2$ ne parvient pas à démolir la combinaison formée par la fuchsine et les diverses substances du microbe.

L'alcool, agissant par la suite, entraîne la couleur safran formée par $\text{SO}^4 \text{H}^2$ et l'excès de fuchsine ; la couleur lilas apparaîtrait, qui ne se fixe sur rien ; en raison de sa très grande diffusibilité, l'alcool comporte également l'acide sulfurique.

L'eau de lavage rend la coloration plus nette en enlevant tout ce qui n'a pas été fixé par le microbe. La différenciation respecte le bacille coloré, comme celui-ci l'était déjà par l'acide sulfurique.

II. — Oxydation de la combinaison colorée

Il nous semble que l'explication donnée de l'acido-résistance est claire et complète. Nous avons voulu connaître un peu la destinée de la combinaison formée par la matière colorante et le microbe. C'est une observation banale que des préparations colorées au Ziehl et abandonnées à l'oxydation lente et progressive de l'atmosphère, deviennent bleues à la longue. Nous avons essayé de reproduire le même phénomène par l'intermédiaire d'une oxydation massive *in situ* et *in vitro*.

1° — RECHERCHES AU NIVEAU DU MICROBE.

Nous avons pris des bacilles tuberculeux isolés du chien, par Goret et Sergent, âgés d'environ dix semaines et cultivés en pomme de terre glycinée. Ces bacilles étaient déjà vieux et l'abondance des granulations de Much nous a gêné dans l'appréciation des résultats. Nous avons soumis le microbe à deux ordres d'épreuves.

1) Nous avons fait des Ziehl entiers, mais, avant de différencier par le bleu de méthylène, nous avons nettoyé les lames avec une solution au 1/3 d'eau oxygénée à 10-12 vol. ou d'acide azotique fumant au 1/3, ou de permanganate de potassium au 1/30°.

Avec l'eau oxygénée, nous avons observé des bacilles tout noirs quant à leur protoplasme, la capsule seule ayant fixé le Ziehl.

Avec NO^3H , la coloration semblable au Ziehl témoin, mais un peu plus foncée.

Avec le permanganate de potasse, nous avons à peu près les mêmes résultats qu'avec H^2O^2 . A un premier examen, les bacilles nous ont semblé roses, mais dès qu'ils étaient au point,

on voyait bien que le protoplasme tout entier était coloré en noir.

La présence d'un grand nombre de granulations augmentait beaucoup les difficultés d'appréciation des différences de coloration.

2) Puisque le composé formé par la fuchsine et le corps gras, s'oxyde facilement à l'air, si on l'oxyde fortement, même avant de faire agir SO^4H^2 , même si on ne fait pas agir cet acide, on doit parvenir néanmoins à le transformer et lui donner la coloration bleue. Nous avons donc employé les mêmes réactifs que plus haut, aux mêmes concentrations. Et nous nous en sommes servis comme décolorants, à la place de SO^4H^2 à 20 pour cent.

L'eau oxygénée se montre macroscopiquement un décolorant moins énergique que l'alcool. Les bacilles prennent le Ziehl.

L'acide nitrique est un très bon décolorant, peut-être même meilleur que SO^4H^2 . Les bacilles prennent le Ziehl.

Le permanganate de potasse ne s'est pas révélé aussi bon décolorant que l'alcool. Sous le microscope, les bacilles sont méconnaissables, bien qu'ayant fixé le Ziehl (moins énergiquement que la préparation témoin). Les microbes ont une apparence de cuit ; le protoplasme semble en dégénérescence.

Devant ces résultats, nous avons pensé que la dilution de permanganate de potasse était trop faible, plus faible même que celle d'acide sulfurique employée dans le même but. Nous avons cru aussi que notre échec était dû à ce que nous ne laissions pas agir nos décolorants pendant assez longtemps.

Nous avons donc repris nos expériences sur une souche bobine Vallée, âgée de trois semaines et cultivée sur pomme de terre glycinée. Dans la préparation témoin, nous avons vu de nombreux bacilles acido-résistants, contenant peu de granulations. Néanmoins, chez certains microbes, le protoplasme est rempli par deux granulations qui sont allongées. Nous

avons même vu des microbes, pas très nombreux, il est vrai, qui n'étaient pas acido-résistants.

Cette-fois-ci, nous avons voulu employer une solution au 1/3 de permanganate de potassium ; nous avons vu qu'à cette concentration, la solution est largement saturée. Nous avons opéré ensuite avec une solution de NO^3H au 1/3.

1) Immersion d'un Ziehl dans une solution saturée de permanganate de K (concentration à 1/3).

Pendant une minute : les bacilles sont plus noirs que les témoins.
pas changé de coloration ; certains apparaissent d'un jaune verdâtre.

Pendant 30 minutes, les bacilles isolés sont méconnaissables ; ils sont représentés par quelques granulations de Much. Dans les petits amas, les bacilles sont tout noirs. Les capsules ne sont plus rouges, mais prennent une teinte jaunâtre.

Dans les gros amas, l'acido-résistance est affaiblie pour la totalité, on note même dans le sein des masses, des foyers bleus (probablement formés par les bacilles qui n'ont pas fixé le Ziehl, comme on en a vu dans la préparation témoin), et des foyers jaunâtres dont la coloration est sûrement engendrée par le permanganate.

2) Immersion d'un Ziehl dans NO^3H au 1/3.

Pendant 1 minute, les bacilles fixent le Ziehl.

Pendant 10 minutes : le protoplasme est noir.

Pendant 20 minutes : Les bacilles sont entièrement noirs. Ils sont violacés lorsqu'ils se trouvent sur le bord des amas qui, eux, sont tout noirs. Parfois on observe de vastes zooglées acido-résistantes, sans bacilles visibles, comme si les granulations ont été dissoutes.

En somme nous devons noter notre échec total à vouloir reproduire par une oxygénation massive, brutale et énergique, un phénomène d'oxydation lente, progressive et continue. Pour pouvoir approcher des conditions naturelles, il faudrait faire agir des oxydants faibles, soit parce qu'ils libèrent peu

d'oxygène à la fois, soit qu'on intervienne par des dilutions très faibles. Mais dans ce dernier cas, l'inconvénient réside dans l'instabilité des oxydants qui se décomposent spontanément.

Aussi avons-nous décidé de fuir l'exiguité des conditions expérimentales (le protoplasme d'un microbe) et les difficultés d'appréciation des colorations (microscopie) en effectuant des recherches *in vitro*. Mais avant de les exposer, nous allons essayer de préciser le mécanisme de cette oxydation.

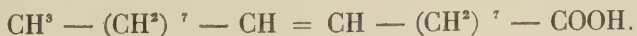
Processus d'oxydation

Pour expliquer le processus d'oxydation, nous mettrons en avant une hypothèse que nous chercherons à vérifier expérimentalement. Il s'agit d'une cascade d'oxydations.

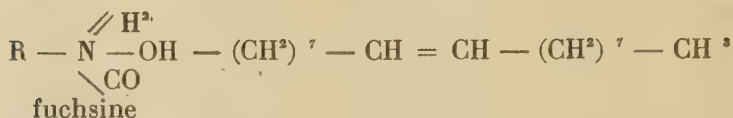
On se souvient qu'à propos des causes de l'acido-résistance, nous avons indiqué le rôle nécessaire des corps gras et notamment des acides gras. Les réactions les plus intenses ont été obtenues avec l'huile de lin qui contient l'acide linoléique. L'oxydation de la combinaison colorée prouve la réalité même, l'existence de cette combinaison.

En effet, un groupe d'acides gras doit être signalé, en raison de leur constitution spéciale qui commande toute leur activité rationnelle. Ce sont les acides oléiques ($C^{18}H^{34}O^2$) linoléique ($C^{18}H^{28}O^2$), ricinoléique ($C^{18}H^{34}O^3$).

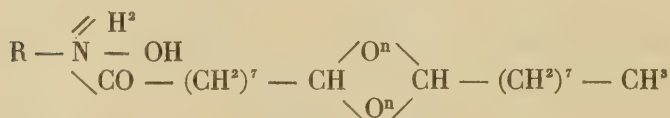
Prenons l'acide oléique à titre d'exemple ; cet acide qui se trouve dans la plupart des corps gras, ne répond pas à la formule générale des acides gras : $C^nH^{2n+2}CO^2H$, mais à la formule $C^nH^{2n-1}CO^2H$ (pour $n = 17$). Il possède donc deux atomes d'hydrogène en moins et pour que la tétravalence inflexible du carbone soit respectée, l'acide oléique présente une double liaison, une liaison éthylénique qui est le point fragile de sa molécule. Nous devons donc écrire ainsi la formule semi-développée de l'acide :



En présence de fuchsine, l'acide réagit et donne un sel par addition :



Ce corps est stable et résiste même à l'action de SO_4H^2 . Mais l'oxydation intervenant, le corps oxydant ne s'attaque pas à la liaison entre l'acide et la fuchsine. La molécule d'oxygène libérée va s'attaquer à la liaison éthylique pour donner un peroxyde de la forme :



Le corps qui était primitivement stable, perd sa stabilité en devenant peroxyde qui quitte en entier le radical fuchsine.

Arrive le second temps : le peroxyde libre détache son oxygène qui, à l'état naissant, s'attaque à la fuchsine. Dans celle-ci, le carbone central du radical méthylique, qui supporte les radicaux phényl, est seul attaqué ; il s'élimine sous forme de gaz carbonique et il reste à peu de choses près, trois noyaux d'aniline. Or, on sait que l'aniline oxydée donne une coloration bleue.

2° — RECHERCHES EN TUBES.

Nous avons mis en présence de l'huile de lin cuite et de la fuchsine à chaud ; et sur la combinaison, nous avons fait agir divers oxydants. Un essai auparavant sur le corps safran, ($\text{SO}_4\text{H}^2 + \text{fuchsine}$) fait avec du bichromate de K qui agit donc en milieu sulfurique, nous a donné une teinte noire si la solution de bichromate est saturée, et une teinte brune semblable à l'huile de lin cuite, si la concentration de bichromate est faible.

L'eau oxygénée à 10-12 volumes diluée au 1/3, agissant directement ou après SO^4H^2 sur la combinaison rouge, ne fait sortir qu'une coloration violette.

L'acide azotique fumant dilué au 1/3, agissant directement sur le corps gras coloré, donne une coloration noire tirant sur le violet ; s'il agit après qu'on ait pratiqué un Ziehl entier la réaction est exothermique, et il surnage, ayant une coloration violette.

Avec le bichromate de K, nous sommes partis de la solution saturée, diluée à 1 p. 2, 1 p. 3, 1 p. 4. Les résultats ont été partout identiques : le corps gras surnage coloré en violet bleuâtre — SO^4H^2 agissant au préalable sur la combinaison fuchsine + corps gras, ne modifie pas le résultat final.

Le permanganate de K pouvait gêner l'appréciation à cause de sa coloration. En versant le réactif sur le corps gras, des parcelles de celui-ci sont restées accolées aux parois du tube. Nous avons vu le même fait avec l'eau oxygénée. Que le permanganate agisse précédé ou non par SO^4H^2 , on obtient le même résultat : le corps gras est coloré en violet comme le réactif.

Après quelques heures de repos, les réactions sont partout les mêmes, sauf en ce qui concerne le permanganate. Avec ce réactif, on obtient au bas du tube un liquide limpide et incolore, en haut, une couche de fuchsine violette tirant sur le bleu. Les parcelles de corps gras qui sont accolées à la paroi du tube, sont également bleu violacé.

Dans tous les tubes, il semble que la fuchsine est récupérée, car la partie correspondant au colorant est fluide maintenant comme si le corps gras avait quitté la fuchsine. Mais on ne voit pas ce corps gras formant une couche à part dans le tube de réaction. Ceci semble nous prouver ainsi que nous l'avons annoncé, que le corps gras, après oxydation de son acide, quitte en entier la fuchsine.

Donc, notre hypothèse semble justifiée, du moins dans sa

première partie ; ce que nous ne pouvons pas prouver, c'est que l'oxygène libéré par le peroxyde, s'attaque au carbone central du radical méthyl ; cela, c'est du domaine de l'hypothèse pure.

CONCLUSIONS

L'acido-résistance est due à une combinaison colorée entre la fuchsine et les corps gras bacillaires, et cette réaction permet la fixation du colorant sur le protoplasme du bacille. Les microbes dépourvus de ces corps gras, de la capsule ciro-graisseuse, ne seront pas acido-résistants, ce qui différencie, au point de vue de l'affinité tinctoriale, les mycobactéries du microbe gram-négatifs.

Cette combinaison a besoin d'un support pour se manifester car, *in vitro*, les résultats sont faibles et dès qu'on lui fournit un substratum même cellulosique, la propriété se révèle.

Cette combinaison s'oxyde lentement à l'air pour donner une coloration bleue ; l'oxydation brutale et instantanée donne une coloration noire.

Si nous nous sommes attachés à l'étude de l'acido-résistance, ce n'est pas uniquement pour satisfaire la curiosité que cette propriété a fait naître. Nous avons vu que l'acido-résistance est sujette à tant de variations qu'elle ne devrait pas servir de point de départ pour classer tout un groupe de microbes. L'étude même de ces variations a amené les savants à déceler l'ultra-virus tuberculeux dont la découverte constitue un fait important dans l'histoire de nos connaissances sur la tuberculose.

Le véritable intérêt de l'étude, l'acido-résistance, réside dans le fait que cette curieuse propriété tinctoriale est concomitante, chez les microbes qui en sont doués, d'avec une structure particulière, et que celle-ci commande dans une large mesure, tout le pouvoir pathogène. Les mycobactéries ont une agressivité faible, lente et sûre, qui ne provoque pas de la part de l'organisme infecté, des réactions humorales et

leucocytaires suffisamment rapides et énergiques pour permettre la formation d'anticorps spécifiques doués d'une efficacité certaine. Quand bien même ces anticorps seraient formés, même en introduisant dans l'organisme des bacilles nus ou similaires, il n'en demeure pas moins évident que ces anticorps se heurteront toujours à la cuirasse graisseuse du bacille de Koch dans une nouvelle invasion.

Or, avant nos recherches, on connaissait déjà la perméabilité de la membrane des bacilles acido-résistants tués. Il faudrait savoir si cette perméabilité existe de même chez le microbe vivant. Il ne resterait plus qu'à trouver la substance susceptible de colorer dans l'organisme même le bacille de Koch vivant, car la plupart des matières colorantes sont aussi des antiseptiques.

Aussi, avant d'arrêter cette étude, nous devons dire notre espoir, à propos de la lutte antituberculeuse dans un chimiothérapie qui nous semble être le procédé d'avenir, et pour mieux préciser notre espoir, dans une chromothérapie spécifique.

Vu : le Président,
LEMIERRE.

Vu le Doyen,
ROUSSY.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

Pour la bibliographie générale de l'Acido-résistance se reporter à :

GORIS (A.). — *Composition chimique du bacille tuberculeux* (Les deux dernières parties en collaboration avec LIOT) (Ann. I. P. 1920, XXXIV, 497).

GORIS (A.), STENDAL (N.). — *Sur la composition chimique du tuberculeux* (Bull. Past. 1933, XXXI, 1 et 65).

AUCLAIR (J.) et PARIS (L.). — *Constitution chimique du bacille de Koch et sa matière unissante. Ses rapports avec l'acido-résistance* (C. R. Acad. Sc. 1907, CXLIV, 278).

AUCLAIR (J.) et PARIS (L.). — *Constitution chimique et propriétés biologiques du protoplasma du bacille de la tuberculose* (Arch. de Méd. exp. et d'Anat. Path. 1908, XX, 737).

BABES et CANTACUZÈNE. — *Recherches sur la maladie expérimentale provoquée par l'inoculation de bacilles tuberculeux dégraissés* (Ann. I. P. 1905, XIX, 699).

BEZANÇON (F.), PHILIBERT (A.), et HAUDUROY (P.). — *Sur la culture de voiles jeunes de bacilles tuberculeux* (C. R. Soc. Biol. 23 Février 1924, XC, 475).

BISHOP et FENSTERMACHER. — *Actinomyces acido-résistants du bœuf*. (The Cornell veterinarian, Juillet 1933).

Analyse de R. LESBOUYRIÈS, In Rec. de Méd. Vét., Février 1934, CX, 103).

BOISSEVAIN (Ch.-H.). — *L'action des acides gras non saturés sur le bacille tuberculeux* (Amer. Rev. Of. Tub. Janvier 1926, XII, 84).

- BORREL (A.). — *Bacilles tuberculeux et paratuberculeux* (Bull. Past. Mai-Juin 1904, 11, 410, 506 et 588).
- CALMETTE (A.). — *Infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux* (3^e édit. en collaboration avec A. BOCQUET et L. NÉGRE, 1928, Paris, Masson édit.).
- CAMUS (J.) et PAGNIEZ (L.). — *Recherches sur les acides gras. Lésions expérimentales* (C. R. Soc. Biol., 26 Novembre 1905, LIX, 386).
- *Propriétés acido-résistantes des acides gras* (C. R. Soc. Biol., 23 Décembre 1905, LIX, 701).
- *Propriétés acido-résistantes des acides gras du bacille tuberculeux* (C. R. Soc. Biol., 23 Décembre 1905, LIX, 703).
- CANTACUZÈNE (J.). — *Phénomènes d'intoxication produits chez le cobaye, par l'injection intra-péritoneale de bacilles tuberculeux dégraissés* (C. R. Soc. Biol., 21 Octobre 1905, LIX, 314).
- *Essai d'immunisation contre l'action toxique des bacilles tuberculeux dégraissés* (C. R. Soc. Biol., 21 Octobre 1905, LIX, 316).
- *Sur l'acido-résistance des cultures jeunes de bacilles de Timothée* (C. R. Soc. Biol., 4 Novembre 1905, LIX, 384).
- CHAMBAZ (H.). — *Recherches immunologiques sur les substances lipidiques et lipoidiques extraites des bacilles tuberculeux tués par la chaleur. Etude de leur pouvoir haptène* (Thèse Vétér., Paris, 1934).
- CIACCO (C.). — *De l'acido-résistance du bacille de Koch* (C. R. Soc. Biol., 22 mars 1906, LX, 585).
- COURMONT (J.) et PANISSET (L.). — *Précis de microbiologie* (Paris, 1914, P. 180 et suiv.).

- DENÈS (G.). — *Recherches sur l'acido-résistance des germes* (Note préliminaire). (Boll. Sez. Italiano Soc. Internaz. Microb., Mais 1933, Fasc. V, 119).
- DOMINGO (P.). et PIERA (E.). — *Modification produites par l'essence de térébenthine sur l'acido-résistance du bacille tuberculeux* (C. R. Soc. Biol., 15 Décembre 1923, LXXXIX, 1231).
- DURAND (H.) et GASPARD (I.). — *Etude de vieilles cultures deséchées de bacilles tuberculeux. Récupération de la propriété acido-résistante* (C. R. Soc. Biol., 16 Juin 1932, CX, 518).
- *Formes atypiques du virus tuberculeux. Retour à la forme commune acido-résistante après culture et inoculation* (C. R. Soc. Biol., 23 Juillet 1932, CX, 1288).
- *Variations morphologiques et tinctoriales du bacille tuberculeux dans les exsudats humains* (C. R. Soc. Biol., 21 Mai 1932, CX, 179).
- FERRAN. — *Nouvelle découverte sur le bacille de la tuberculose et la solution expérimentale du problème de la prophylaxie et de la guérison de cette maladie* (C. R. Acad. Sc. 1898, CXXVI, 1555).
- FONTES (A.). — *L'ultra-virur tuberculeux* (1932, Paris, Masson, Edit.).
- ISABOLINSKY (M.-P.) et GUITOVITCH (V.-I.). — Smolemsk, — *De la bactériolyse des bacilles tuberculeux* (Journ. Microb. Path. et mal. Inf. (en russe), 1926, II, fasc. IV, 53).
- LANGERON (M.). — *Précis de microscopie*. Chap. Coloration, p. 368 (1921, Paris, Masson, édit.).
- LOMBARDO PELLGRINO. — *Sur les bacilles acido-résistants* (Ann. d'Ig. sperim. 1906, XVI, fasc. II, 163).

- MACHEBOEUF (M.), LÉVY (G.) et FETHKE (N.). — *Etudes chimiques sur le bacille tuberculeux* (1^{er} Mémoire). *Essai préliminaire et de fractionnement des substances lipoidiques des corps bacillaires tués par la chaleur*. (En collaboration avec J. DIERYCK et A. BONNEFOI) (Ann. I. P. 1934, LII, 277).
- MACHEBOEUF (M.), SIERYCK (J.) et STOOP (R.). — *Etudes chimiques sur le bacille tuberculeux* (2^e Mémoire). *Extraction fractionnée de diverses substances lipoidiques de bacilles frais et non chauffés* (Ann. I. P. 1935, LIV, 71).
- MARTIN (L.) et VAUDREMER (A.). — *Bacilles tuberculeux dégradés* (C. R. Soc. Biol., 13 Octobre 1906, LXI, 258).
- NICOLAS (E.). — *Cours de chimie médicale et pharmaceutique. Chimie organique : corps gras, Matières colorantes* (Professé à l'Ecole d'Alfort pendant l'année 1930-31).
— *Cours de chimiothérapie* (Professé à l'Institut de Médecine Vétérinaire Exotique, 1934-1935).
- PANISSET (L.). — *Cours de Pathologie contagieuse exotique* (Professé à l'Institut de Médecine Vétérinaire Exotique, 1934-1935).
- PELL-PAOLO (L.). — *Culture sur graisse de Streptothricées et de quelques autres bactéries* (Ann. d'lg. spér., 1904, XIV, Fasc. IV, 533).
- SORDELLI (A.) et ARENA (A.). — *Interprétation de l'acido-résistance du mycobactérium tuberculosis* (C. R. Soc. Biol., 7 Juin 1934, CXVII, 63).
- SPHEL (P.). — *Contribution à l'étude de l'acido-résistance du bacille tuberculeux en milieu homogène* (Soc. Biol. Belge, 30 Avril 1931, in C. R. Soc. Biol. 1921, LXXXIV, 835).

- SWEANY (H.-C.). — *La récupération de l'acido-résistance chez les bacilles tuberculeux en apparence dégénérés* (Amer. Rev. Of. Tub., Novembre 1928, XVIII, 630).
- VALLÉE. — *Bacilles tuberculeux dégraissés* (C. R. Soc. Biol. 1906, LX, 1020).
- VAUDREMER (A.). — *Un bacille tuberculeux humain et un bacille tuberculeux bovin acido-résistants facultatifs* (C. R. Soc. Biol., 5 Février 1921, LXXXIV, 259).
- WARNERY (M.). — *Sur la résistance des bacilles tuberculeux à l'acide sulfurique suivant l'âge des cultures* (C. R. Soc. Biol., 12 Novembre 1932, CXI, 575).
-

TABLE DES MATIERES

	PAGES
Avant Propos	9
Préface	13

ACIDO-RESISTANCE

PREMIERE PARTIE

A. — Généralités	16
B. — Définition	18
C. — Caractères	19
1° Variabilité	20
a) Absence de l'A. R.	20
b) <i>Perte de l'A. R. — Régénération</i>	24
2° Non spécificité	28
a) Acido-résistants mal connus.....	29
b) Champignons acido-résistants	29
c) Création de l'acido-résistance	29

SECONDE PARTIE

A. — Causes de l'acido-résistance	31
Théories physiques	32
Théories physico-chimiques	32
Théories chimiques	33
1° A. R. due à un protide	34
2° A. R. due à un lipide	34
3° A. R. due à une substance indéterminée ..	40
4° A. R. due à plusieurs substances	41

	PAGES
B. — Genèse du substratum de l'A. R.	42
C. — Discussion des résultats	44

TROISIEME PARTIE

<i>Expérimentation et essai d'explication</i>	60
1. — Recherches sur l'acido-résistance	64
1° Expériences sur les huiles végétales	65
2° Expériences sur les corps gras animaux	73
3° Expériences sur papier filtre et sur lame	81
II. — Oxydation de la combinaison colorée	86
1° Recherches au niveau du microbe	86
Processus de l'oxydation	89
2° Recherches en tubes	90
III. — CONCLUSIONS	93
IV. — BIBLIOGRAPHIE	95
